

GOVP1199904528

632.95

L2930

최 종
연구보고서

무공해 해충방제제 개발 Development of Biopesticides

미생물 살충제 개발
Development of Microbial Insecticides

식물성 살충제 개발
Development of Plant-derived Insecticides

연구 기관
서울대학교 농업생명과학대학

농 립 부

‘ , .

1998. 12. 29.

:
:
: ,
 ,
 ,
 ,
 ,
 ,
 ,
:
: ,
 ,

.

.

.

,

가

,

가

가

Bt Baculovirus

,

.

,

.

.

1. 1 :

1) Bt
Bt

가

Bt

Bt

,

Bt

. Bt

가

가

Bt

. 가

가

가

, Bt

가

,

,

가

가

,

,

pot

,

,

,

,

,

.

,

.

,

,

,

.

2)

가

Baculovirus

, Baculovirus

, Baculovirus

Baculovirus

,

가

가

가

,

,

,

,

,

2. 2 :

15 , , ,
(, ,)
)
column
chromatography, , spectral techniques, (GC-MS, IR, UV, ¹H
C-NMR)
mouse 48
, Salmonella
,
(, ,)
(, ,)

1. 1 -

1) Bt
가
Bt 가 .
가 Bt

353 Bt

3 1 37

Bt , 2 , 3 7

STB-1, STB-2, STB-3, STB-4, STB-5, STB-6, STB-7
, 3 STB-1, STB-3, STB-6, STB-7 4 100%
, STB-2, STB-4, STB-5 80%

. 100% 33

STB-1 H3a3b Bt subsp. *kurstaki*, STB-3
H4a4c Bt subsp. *kenyae* , STB-6, STB-7 Bt subsp. *aizawai*
, bipyramid

130 kDa 65 kDa .

cry primer PCR STB-1 *cryIA(a)*,
cryIA(b), *cryIA(c)*, *cryIE*, *cryII*, STB-3 *cryIE*, STB-4 *cryIA(b)*, *cryII*, STB-6,
STB-7 *cryIA(a)*, *cryIA(b)*, *cryIC*, *cryIF*, *cryII* 가
STB-1 Bt subsp. *kurstaki* 가
STB-3 Bt subsp. *kenyae*

, STB-1 , 100% 가

Bt subsp. *kurstaki*

52.5%

Bt subsp. *kenyae*가 55%

Bt 가

Bt 4

Bt

가

가

329 Bt

, 가 41 . Bt

가 가 가

. Bt Bt

electroporation

가

Bt

가

Bt NT0423

가

5

SW(,) Bt

가 Bt

: 3 : 2 (SW32)

Bt 1

, 72 96

4% 5% 가

. 7 spore colony count
 Bt 4-5
 4×10⁹ ml , 1.3×10⁹ ml
 가 Bt
 가 ,
 가
 3% (w/v) 2% (w/v)
 1.0 vvm 200 rpm Bt
 Bt
 pH 5.5 가
 24 가 96 pH가 8.4 가
 pH 7.0 .
 가 , 가
 Bt
 , glucose 10 g/L 가 glucose가 가
 glucose 가
 glucose
 50% 60%
 , 50% 8 가

16 가 16
 . , 24 가 54
 가 가 72
 . 60%
 50% 22% 가 , 72
 73% 가
 86.4% 가 .
 가
 . Bt 가 50 L 30
 L pH 7.0
 가 가 .
 1.0 vvm 400 rpm 가
 2.5×10^9 CFU/mL 2.2×10^9 CFU/mL 88% 12
 , 72
 .
 Bt 가
 1 Bt
 NT0423 5 1×10^{10} cell/ml
 가 (BioBact)
 . 10% , 20% ,
 40% . Bt 가 10%
 M₀ 5×10^9 - 1×10^{10} 가 Bt polyoxyethylene
 alkyl aryl sulfate sodium naphthalene sulfonate formaldehyde condensate가,
 white carbon, sucrose,

kaoline formulation I, II, III , ,
formulation III . Formulation
white carbon , 11 , (particle size) 11 μm 가
99%, 44 μm 1% 가 , BioBact
10% Bt 가 가 BioBact 20% 40%
. pH 20 5.9 가 Bt
. 3
, , ,
. 가 ,
가
. BioBact 20%
40% A (Bt subsp. *kurstaki* type), B (Bt subsp. *aizawai*
type) 100% 가
. BioBact 20%
1,000 70% , BioBact 40% 1,000 85%
A (Bt *kurstaki* type), B (Bt *aizawai* type)
. Bt NT0423 BioBact 10%, BioBact 20%, BioBact
40% Bt A (Bt subsp. *kurstaki* type) B (Bt subsp.
aizawai type) SDS-PAGE 5 Bt
130- 140 kDa 가

가

BioBact가

Bt NT0423

BioBact 20% 40% 가

, A B

BioBact 가

BioBact

3 2

BioBact

20% 40%

가

BioBact 20%

40%,

A B,

, Bt NT0423

3 7

가

7

, 2 , Bt

NT0423

BioBact 20% 40%

가

Bt

가 4 20

, 30

8

, Bt 가

Bt

BioBact®

Bt

2)

가

			LD50	LT50		, LD50
3	1.64×10^4	/M ℓ	, 4	3	2.5	4.28
$\times 10^4$	/M ℓ	, 5	3	390	6.40×10^6	
/M ℓ			. LT50		가	
					, 5	
			25	20	25	
	1					
					, 4	1.0
$\times 10^6$	/M ℓ				가	
	8	2.21×10^{12}				

Baculovirus

가 가

가

가

, baculovirus

Bt

baculovirus

baculovirus Btrus

3

36.4%

,

5

refusal diet

. Bt

2

baculovirus

가

, 가
 White carbon 1%,
 sucrose 1%, polyvinylalcohol 0.5%,
 Triton X-100 0.1% .
 ,
 ,
 , polyvinylalcohol
 가
 ,
 2 × 10⁶ /Mℓ 67.4%, 1 × 10⁷ /Mℓ
 85.7%, 2 × 10⁷ /Mℓ 87.5% 41.7%,
 58.5%, 60.0% 가
 , 1 × 10⁷ /Mℓ 가
 .
 potentiator 가 , 0.05%
 Bt 가 10 100%
 .
 V
 ,
 .
 V
 가 가

가 , 가 .

2. 2 -

가 ,
(IPM) 가
가 .

1)

20 7 ,
100% , , , 80% ,
, , 80% .
80 % .

72 15 (), 가
, 15

..

150 5

5000 ppm .

95%

70%

가

80%

26

80-90%

70-80%

70-80%

22

5000,

2500ppm 5,000 2,500ppm

30 49 84

0.5 μ g 11

; *Adhatoda vasica* (100%), *Annona squamosa* (100%), *Nerium indicum* (100%), *Clerodendrum inerme* (90%), *Pongamia pinnata* (95%), *Prosopis chinensis* (90%), *Vitex negundo* (90%), *Azadirachta indica* (89%) (85%), *Aegle marmelos* (88%) *Madhuca indica* (88%).
Annona squamosa 0.25µg 100%

52 119 49 84

가 ginkgolides A, B,
 C bilobalide Bilobalide
 carbofuran fenobucarb
 Bilobalide ginkgolides C 0.01µg
 30 mice
 (LD50 > 1,000mg/kg) , 4 *Salmonella typhimurium*

7

ar- turmerone

. 4 *Salmonella typhimurium*

ar- turmerone

2)

17 45

가

80%

Hyphantria cunea 4

Agelastica coerulea

isoquinoline alkaloid

palmatine iodide coptisine chloride

berberine chloride

. *H. cunea* , palmatine iodide

berberine chloride 1:1 (w/w)

palmatine iodide (70%)

berberine chloride (60%)

, 500 ppm

(100%)

, 250 ppm 81%

. *A.*

coerulea

, 125 ppm 250 ppm berberine chloride 55 % ,

93 %

, 500 ppm palmatine iodide

coptisine chloride 35 % 44 %

H. cunea *A. coerulea*

H. cunea *A. coerulea*

eugenol isoengenol

. *H. cunea* *A.*

coerulea

berberine palmatine ,

berberine 0.5 mg, 0.25 mg

, palmatine berberine

, berberine 125 ppm
, palmatine

3)

32 54

cinnamaldehyde

4 (cinnamyl alcohol, *trans*-cinnamic acid, eugenol, salicylaldehyde)

. Cinnamaldehyde cinnamyl alcohol

, salicylaldehyde

trans-cinnamic eugenol . Cinnamaldehyde

cinnamyl alcohol 2.5% 5%

, 1%

- pinene dibutyl phthalate

6 (hexadecane, -caryophyllene, naphthalene,

- pinene, camphor, menthol)

, hexadecane 가 , dibutyl phthalate

- pinene

(1,8- cineol, - pinene, - pinene, cinnamyl

alcohol, menthol, geraniol, cinnamaldehyde, dipentene, linalool, eugenol,

cuminaldehyde, cinnamic acid) - pinene, - pinene,

cinnamaldehyde

,

15

.

SUMMARY

Development of Bioinsecticides

. Development of Microbial Insecticides

1. Development of *Bacillus thuringiensis* Insecticides

To develop microbial insecticide of *Bacillus thuringiensis*, we isolated various Bt isolates which had higher toxicity and/or broaden host spectrum. Specially, 4 Bt strains toxic against *Spodoptera species* from Korea were selected and named as STB-1, STB-3, STB-6, and STB-7, respectively. From the H-serotype tests of the isolates, STB-1 appeared to be Bt subsp. *kurstaki*, STB-3 to be Bt subsp. *kenyae*, STB-6 and STB-7 to be Bt subsp. *aizawai*. All of the isolates had bipyramida shaped crystals which showed 130 kDa major and/or 65 kDa minor protein bands in SDS-PAGE. PCR analysis with specific *cry* gene primer sets showed the crystal protein-genotypes of the isolates. Dissimilar to reference strains, Bt subsp. *kurstaki* HD-1, STB-1 had *cryIA(a)*, *cryIA(b)*, *cryIA(c)* and *cryIE*. STB-3 had only *cryIE* gene. In bioassay against *Bombyx mori* and *S. exigua*, STB-1 showed high toxicity to both insects. From these results, STB-1 was new Bt strain which had broaden host specificity and could be the promising candidate of microbial insecticide

In addition, 4 Bt strains, Ag10, Aa18, Ag21, Aa22 were isolated from dead larvae of *Apriona germari* and *Aphodius apicalis* and lepidoptera and/or mosquito specific 41 Bt strains were isolated from soil and dust samples from Korea.

To develop and recover the insecticidal activity of Bt strains, we introduced

mosquitocidal *cry* genes (*cryIVD* and *cytA*) into nontoxic strain, Bt NTB-1 by electroporation, identified the expression of CryIVD and CytA proteins and the recover of mosquitocidal activity.

Microbial-control agents were prepared with Bt NT0423 strain having unique properties which had toxicity to lepidoptera and diptera. For efficient and economical production of microbial-control agents, new culture medium and condition were developed. This medium consisted of agricultural wastes like soybean cake and wheat bran, was used to establish a standard culture system of Bt. The experimental studies to optimize the operational condition of batch culture for the mass production, the medium composition and culture conditions for enhancing the yields and the sporulation of Bt were carried out. This medium was proven to be more efficient than GYS medium which had been widely used for a long time. From various ratios of soybean cake to wheat bran, 3:2 condition was proper to maximized Bt growth. And from the content of culture media, 4 or 5% was selected. Experiments were carried out to investigate the effects of the addition of mineral salts and glucose, and of dissolved oxygen concentration on the cell growth and spore formation of Bt using the cheap new media in the batch culture.

The cell growth and spore formation were not enhanced by the addition of mineral salts in industrial medium, whereas the addition of 10 g/L glucose decreased a cell growth and spore formation. We could obtain a maximum viable cell number and spore number at the dissolved oxygen concentration of 60% of that at saturation. In the bench-scale culture, the maximum viable cell and spore number were 2.5×10^9 CFU/mL and 2.2×10^9 CFU/mL, respectively under 1.0 vvm aeration and 400 rpm agitation. The spore yield was 88% based on the maximum viable cell number. It was hence, confirmed that the production of high spore

concentration could be obtained by a bench-scale culture using this industrial medium.

After the mass culture of Bt with the industrial media system, three Bt formulations, designated to BioBact 10%, 20% and 40% were made with various combinations of adjuvants. Polyoxyethylene alkyl aryl sulfate and sodium naphthalene sulfonate formaldehyde condensate were used as a detergent, white carbon as an absorbent, sucrose as nutrient, kaoline as carrier. These formulations showed good physical properties in wettability, suspensibility, particle size and adherence. In addition, the result of SDS-PAGE analysis indicated that δ -endotoxin remain stably in all formulations. Among the tested formulations, wettable powder formulation comprising of 20% and 40% of Bt powder (BioBact) showed best control effect on diamondback moth larvae in laboratory, greenhouse and field tests.

The adherence of BioBact 20% and 40% was better and contained much amount of endotoxin than than the commercial products (Bt subsp. *kurstaki* and Bt subsp. *aizawai* type). Especially, when compared with commercial Bt formulation (A and B commercial formulations) in field evaluation, BioBact 20% and 40% formulation showed equal activity up to 80% lethality and a good persistence effect which remain on leaves at least 7 days. The test of the deterioration of BioBact along the long period stock in various temperature, all products including the commercial products were very stable in 4 and 20 .

Based on these results, we do test for registration of BioBact with the collaborated company now.

2. Development of Baculovirus Insecticides

For the control of *Spodoptera exigua*, pathogenicity of *Spodoptera exigua* nucleo

polyhedrovirus (SeNPV) against this insect pest was studied. The median lethal dose (LD₅₀) of the SeNPV to 3rd instar larvae was 1.64×10^4 PIB/M ℓ and lower than that to the 4th and 5th instar larvae by 2.4 and 390 times, respectively. The median lethal time (LT₅₀) was decreased as the concentration of viral inoculum was increased, and there was much difference between lower viral concentration and higher viral concentration. Also, for the formulation of SeNPV, the mass production system of SeNPV was established. Based on these results, the SeNPV was formulated by addition of feeding attractant, anti-precipitate of polyhedra, spreading agent and UV-protectant. The SeNPV formulation was effective to *S. exigua* and stable against field conditions such as temperature, sun-light etc. The effectiveness of SeNPV formulation against target insect, *S. exigua*, was dramatically increased by addition of 0.05% Bt NT0423 strain. These results suggested that the SeNPV formulation was useful as the control agent for *S. exigua*.

. Development of Plant-Derived Insecticides

The economic losses due to arthropod pests in crops may be 5-50%, or even higher in developing countries. Additionally, rodents not only cause great damage in agriculture and forestry, but also generate serious problems for communication systems, structures and human health. Over the past decades, various attempts to control pests have taken an effort toward effective eradication or prevention through the development of synthetic pesticides. Although they have effectively controlled various pests, their continued or repeated use has disrupted biological control by natural enemies and led to outbreaks in arthropod pests, the development of widespread resistance to various types of insecticides and acaricides, toxicity to

nontarget organisms, environmental problems, and human health hazards. Decreasing efficacy and increasing concern over adverse environmental effects of the earlier types of pesticides have brought about the need for the development of new types of selective control alternatives or of methods of crop protection without, or with reduced, use of conventional pesticides.

Plants may be an alternative to currently used pest control agents because they virtually constitute a rich source of bioactive chemicals. Since these are often active against a limited number of species including specific target pests, are biodegradable to nontoxic products, and potentially suitable for use of integrated pest management, they could lead to the development of new classes of possibly safer pest control agents. Therefore, much efforts have been focused on plant materials for potentially useful products as commercial pesticides or as lead compounds.

In the laboratory study described herein, we assessed biological activities (insecticidal, acaricidal, antifeeding, repellent, and antignawing) of aromatic medicinal, domestic and Indian plant, cereal and legume species against seven important arthropod pests and rodents.

1. Development of Plant-Origin of Insecticides

Methanol extracts from 54 aromatic plant species in 32 families were tested at 5000 ppm for their insecticidal, acaricidal and antifeeding activities against five important arthropod pests by spray method. The responses varied with arthropod pest species, plant species and plant tissue sampled. In a test with *Nilaparvata lugens* Stal, extracts of *Ginkgo biloba* leaves (100% mortality), *Eugenia aromatica*, *Piper nigrum*, *Ligusticum chuanxiong*, *Curcuma longa* (80% mortality) showed

potent insecticidal activity. For *Plutella xylostella* L., potent larvicidal activity was observed from extracts of *P. nigrum*, *L. chuanxiong*, *C. longa* extracts. In a test with *Tetranychus urticae* Koch, extract of *Dioscorea batatas* showed potent acaricidal activity (80% mortality). All test plant samples revealed little or no insecticidal activity against *Mysus persicae* Sulzer and *Spodoptera litura* L. For *Sitophilus oryzae*, *Paeonia suffruticosa*, *Eugenia aromatica*, *Acorus gramineus* observed potent insecticidal activity. Additionally in tested plants, an insecticidal activity against *Callosobruchus chinensis* has not observed. As a naturally occurring control agent, derivatives of plants described herein could be useful as new insecticidal and acaricidal products against various arthropod pests

Methanol extracts of 150 domestic plant species were tested insecticidal activity. *Zanthoxylum piperitum* barks, *Chamaecyparis obtusa* leaves and *Lindera erythrocarpa* leaves showed potent insecticidal activity. For *P. xylostella*, insecticidal activity was observed from extract of *Zanthoxylum piperitum* barks (70% mortality), but the others were not shown. All test plants revealed little or no insecticidal activity against *S. litura*. For *T.urticae*, extracts of *Elaeagnus macrophylla* leaf, *Securinega suffruticosa* leaf and stem, *Aralia elata* leaf, *Zanthoxylum piperitum* bark, *Quercus salicina* leaf, *Vaccinium bracteatum* leaf showed potent acaricidal activity (>80% mortality).

Methanol extract of 26 Cheju island plant species were tested insecticidal activity. For *N. lugens*, extracts of *Symplocos priumifolia*, *Cornus walteri*, *Platycarya strobilacea*, *Cornus walteri*, *Magnolia denudata*, *Torreya nucifera* showed potent insecticidal activity (80-90% mortality). In a test with *P. xylostella*, extracts of *Pinus leveilleana*, *Symplocos priumifolia*, *Cornus walteri*, *Lonicera maackii*, *Platycarya strobilacea*, *Carpinus cordata*, *Elaeocarpus sylvestris*, *Pittosporum tobira*, *Styrax japonica*, *Cornus walteri*, *Hex rotunda*, *Torreya nucifera*

showed insecticidal activity. But all test plants revealed no insecticidal activity against *S. litura*. For *T. urticae*, extracts of *Pinus levilleana*, *Symplocos priumifolia*, *Cornus walteri*, *Lonicera maackii*, *Castanopsis cuspidata*, *Platycarya strobilacea*, *Raphiolepis umbellata*, *Elaeocarpus sylvestris*, *Pittosporum tobira*, *Styrax japonica*, *Cornus walteri*, *Hex rotund*, *Ficus nipponica*, *Sapindus mukorossi*, *Magnolia denudata*, *Torreya nucifera* showed acaricidal activity (70- 80% mortality).

The insecticidal activity of 22 domestic cereals bioassayed by microtopical applicator against BPH and leaf dipping method against GPA and TSSM. The methanol extracts from *Hordeum vulgare* and *Oryzae sativa* showed potent insecticidal activity against BPH, *Fiagopyrum esculentum* showed potent insecticidal activity against GPA at 5000, 2500 ppm and *Fiagopyrum esculentum*, *Panicum miliaceum*, *Triticum aestivum*, *Ischaemum crassipes*, *Sorghum bicolor*, *Sesamum indicum*, *Oryzae sativa* showed potent activity against TSSM at 5000, 2500 ppm. But, methanol extracts of 25 legume seed didn't show insecticidal activity against BPH, DBM, GPA, TCW, TSSM.

Methanol extracts from 84 samples of 49 Indian plant species in 30 families were tested for their insecticidal activities against the brown planthopper (*Nilaparvata lugens* STAL), using a topical application method. The activity varied with both plant species and tissue sampled. At a dose of 0.5 µg/female, the following 11 plant species revealed significant insecticidal activity: *Adhatoda vasica* leaves (100% mortality), *Annona squamosa* seeds (100%), *Nerium indicum* stems (100%), *Clerodendrum inerme* whole plants (90%), *Pongamia pinnata* seeds (95%), *Prosopis chinensis* stems (90%), *Vitex negundo* leaves (90%), *Azadirachta indica* seeds (89%) and stems (85%), *Aegle marmelos* leaves (88%), and *Madhuca indica* seed oil (88%). However, the extract of *A. squamosa* seeds alone exhibited

significant activity (100% mortality) even at 0.25 μg /female. As naturally occurring insecticides, these tropical plant-derived materials could be useful as an alternative for synthetic insecticides for managing field populations of *N. lugens*.

Methanol extracts from 119 samples of 52 domestic plant species, 84 samples of 49 Indian plant species were tested for their insecticidal activities against the brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) using spray or topical application method. A foliar extract of *Ginkgo biloba* L. (Ginkgoaceae) revealed the most potent insecticidal activity against BPH. The active constituents were isolated by spectral analysis as ginkgolides A, B and C, and bilobalide. Bilobalide revealed much more potent insecticidal activity against susceptible BPH than the commonly used carbamate insecticides carbofuran and fenobucarb. At a dose of 0.01 μg /female, topically-applied bilobalide and ginkgolide C caused signs of toxicity such as tremors and paralysis, and the insects died within 30 min of treatment. These compounds were relatively non-toxic to mice ($\text{LD}_{50} > 1,000$ mg/kg) and was not mutagenic, when tested against four strains of *Salmonella typhimurium*. As active ingredients of a naturally occurring insecticide, *G. biloba*-derived materials could be useful as a new control agent for various planthoppers and leafhoppers.

The insecticidal activities of *Curcuma longa* root-derived materials were examined for their insecticidal activities against seven arthropod pests using leaf-dipping method. The active constituent was isolated by spectral analysis as *ar*-tumerone. This compound not only revealed potent insecticidal activity against BPH(*N. lugens*) and DBM(*P. xylostella*), but also was highly effective against TLB(*Phytophthora infestans*) and BPM(*Erysiphe graminis*). This compound was mutagenic, when tested against four strains of *Salmonella typhimurium*. As active ingredients of a naturally occurring insecticide, *C. longa*-derived materials could be

useful as a new control agent against various insect pests and plant diseases induced by plant pathogens.

2. Development of Plant-Origin of Insect Antifeedants and Repellents

Methanol extracts from 45 species of oriental medicinal plants belonging to 17 families were subjected to a screening test for their antifeeding and repellent activities against two species of lepidopteran larvae, diamondback moth (*Plutella xylostella* L.) and tobacco cutworm (*Spodoptera litura* F.) by a leaf-dipping method. Antifeeding activities were both insect and plant species dependent.

Paeonia suffruticosa showed most potent repellent and insecticidal activity of the tested plants against *Stophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*, and *Eugenia aromatica* showed 80% repellent activity against *S. oryzae* but tested all plants were not observed an activity against *C. chinensis*.

The antifeeding activities of *Coptis japonica* (Makino) root-derived materials toward *Hyphantria cunea* larvae (4th instar) and *Agelastica coerulea* adults were examined using leaf dipping method, and compared to that of two commercially available isoquinoline alkaloids palmatine iodide and coptisine chloride. The biologically active constituent of the *Coptis* roots were characterized as the isoquinoline alkaloid berberine chloride by spectral analysis. In a test with *H. cunea* larvae, the antifeeding activity was much more pronounced in application of mixture of palmatine iodide and berberine chloride (1 : 1, w/w) at 250 ppm (81%) and 500 ppm (100%), compared with palmatine iodide (77%) and berberine chloride (60%) alone at 500 ppm. These results indicate that synergistic effect might be involved in the phenomena. With *A. courulea* adults, berberine chloride showed 55 and 93% antifeeding activity at 125 and 250 ppm, respectively whereas weak activity was

obtained in application of 500 ppm of palmatine iodide (35%) and coptisine chloride (44%). It is concluded that the *Coptis* root-derived materials might be useful products for managing *H. cunea* populations of mulberry or protecting furniture damage caused by *A. coerulea*.

The antifeeding activities of *Eugenia aromatica*-derived materials toward *Hyphantria cunea* larvae (4th instar) and *Agelastica coerulea* adults were examined using leaf dipping method. The biologically active constituent of the *Eugenia* roots were characterized as eugenol and isoeugenol by spectral analysis. It is concluded that the *Eugenia* root-derived materials might be useful products for managing *H. cunea* populations of mulberry or protecting furniture damage caused by *A. coerulea*.

3. Development of Plant-Origin of Rodent Repellents

Methanol extracts of 54 plant species in 32 families were tested for their antignawing activities against mice by wire-dipping method. The activity varied with plant species. Potent antignawing activity was observed in extracts from roots of *Aucklandia lappa* (Compositae), barks of *Cinnamomum cassia* (Lauraceae), fruits of *Illicium verum* (Magnoliaceae), fruits of *Piper nigrum* (Piperaceae), rhizomes of *Rheum officinale* (Polygonaceae), and leaves of *Pinus densiflora* (Pinaceae). As naturally occurring rodent repellents, these plant-derived materials could be useful as a preventive agent against various kinds of damage caused by rodents.

The antignawing activities of cinnamomi cortex (the dried bark of *Cinnamomum cassia* Blume)- and *Pinus densiflora* leaf-derived materials against laboratory-reared mice were evaluated using a wire-dipping method. The biologically active component of *C. cassia* bark was characterized by spectral analysis as

cinnamaldehyde. The antignawing activity of the compound was compared with that of four commercially available compounds: cinnamyl alcohol, *trans*-cinnamic acid, eugenol and salicylaldehyde. Cinnamaldehyde and cinnamyl alcohol exhibited potent repellent activity, whereas little or no activity was produced from salicylaldehyde. Moderate activity was observed in *trans*-cinnamic acid and eugenol. Cinnamaldehyde and cinnamyl alcohol exhibited potent and moderate repellent activity at 5 and 2.5% solutions of these compounds in ethanol, respectively, whereas little or no activity was observed in 1% solution. The biologically active components of the *Pinus* leaves were characterized by spectral analysis as the terpenoids α -pinene and β -pinene. The antignawing activity of the compounds was compared with that of six commercially available compounds: 1-menthol, 1,8-cineol, geraniol, dipentene, linalool, and cuminaldehyde. α -Pinene and β -pinene exhibited potent repellent activity, whereas little or no activity was produced from 1-menthol, 1,8-cineol, geraniol and linalool. Moderate activity was observed in dipentene and cuminaldehyde. β -Pinene exhibited potent repellent activity at 5% solution of this compound in ethanol, whereas little or no activity was observed in 2.5 and 1% solutions. As a naturally occurring repellent, *C. cassia* bark- and *P. densiflora* leaf-derived materials could be useful as a new preventive agent against various kinds of damage caused by rodents.

CONTENTS

Chapter 1. Introductory Remark	
Section 1. Objectives and Importances of Research and Development	
Section 2. Contents and Scopes of Research and Development	
Chapter 2. Development of <i>Bacillus thuringiensis</i> Insecticides	
Section 1. Introduction	
Section 2. Materials and Methods	
Section 3. Results and Discussion	
Section 4. Summarized Results	
Section 5. Remarks	
Section 6. Cited Literatures	
Chapter 3. Development of Baculovirus Insecticides	
Section 1. Introduction	
Section 2. Materials and Methods	
Section 3. Results and Discussion	
Section 4. Summarized Results	
Section 5. Remarks	
Section 6. Cited Literatures	
Chapter 4. Development of Plant-Derived Pesticides	
Section 1. Development of Plant-Origin of Insecticides	
Section 2. Development of Plant-Origin of Insect antifeedants and repellents	
Section 3. Development of Plant-Origin of Rodent Repellents	
Section 4. Summarized Results	
Section 5. Remarks	

1	
1	
2	
2	Bt
1	
2	
3	
4	
5	
6	
3	
1	
2	
3	
4	
5	
6	
4	
1	
2	
3	
4	
5	

1

1

1.

가
20 (1990) , 2,000 30
1990 6 2000 8 7,000
5.4%

가 ,

10 ,

가 .

가

가 가

가 , 가

가 .

Bt Baculovirus

(;)

	1980	1985	1990	2000	
	35,670	53,063	53,252	96,000	5.3
	30,188	37,500	46,312	83,500	5.4
	16,358	21,000	29,551	53,250	5.0
	4,785	7,688	9,638	17,250	7.0
	87,181	119,251	138,753	250,000	

2.

1)

(1)

가 (Bt,)

가

가

, *Bacillus thuringiensis* (

Bt)

가

,

가

Baculovirus

가

recombinant virus

가

가 .

,

,

,

가

가 가

.

,

,

.

(2) .

20

,

29% 6 9

,

Bt

80

2,400

89

1

700

11%

가

99

3

.

Bt

,

50

50- 60% 가

.

2,000

30%

4 2,000 - 5 6,000

,

가

.

,

Bt (Thuricide, Dipel)

,

,

,

,

,

가가

(3)

Bt

가

가

2)

(1)

KIST

가

1992 - 1995 (3)

Bt

가 Bt NT0423

GenBank

Bt NT0423

(Biochem. Biophys. Res.

Comm. 1995)

KIST

(NPV)

가

, 150

5

(J. Econ. Entomol. 1994).

bilobalide ,

carvacrol

methyl gallate ,

kihadanin, berberine ,

(2)

66 ,

40 .

Bt 가

14

가

800

1960

Bt ,

Mycogen, IRRI

Bt

Bt

1992

20

Bt

, Bt

FDA

1980

, 1992

가

12

가

3)

가

가

4)

Bt

가

가

. Bt

가

65%

(, , , , ,)

가

5) 가 가?
가 (Royalty) , , ?

, (Know-How)
,
(Know-How)

2

1.

Bt Baculovirus

2.

1) 1 :

(1) Bt

1 (1996)	Bt 가	◦ Bt ◦ Bt ◦ Bt ◦ Bt ◦ Bt
2 (1997)		◦ <i>Spodoptera</i> 가 ◦ ◦ ◦ ◦ ◦ ◦ ◦
3 (1998)		◦ ◦ ◦ ◦ ◦

(2)

1 (1996)	Baculovirus	◦ Baculovirus ◦ Baculovirus ◦ ◦
2 (1997)	Baculovirus	◦ <i>Spodoptera</i> ◦ 가 ◦ ◦ ◦ ◦ ◦ ◦ ◦
3 (1998)		◦ ◦ ◦ ◦ ◦

2) 2 :

1 (1996)		<ul style="list-style-type: none">ooooo
2 (1997)		<ul style="list-style-type: none">oooo
3 (1998)		<ul style="list-style-type: none">o Mouseooooooo

3.

1)

(1) 1 :

Bt Bt , ,

Bt ,

. Bt

()

가

Baculovirus

Baculovirus

KIST

()

(2) 2 :

J. Economic Entomology, Pesticide Science, J. Pesticide Science, J. Natural products,

J. Chemical Ecology, Agricultural and Food Chemistry, Aquatic Toxicology

IUPAC, British Plant Protection, International Plant Protection

,
.
가
, , 가 가
,
가가 .

2)

(1) 1 :

- Bt

Bt

Bt

Bt

Bt

, Bt

electroporation

Bt

가

, 가

Bt

. Bt

가

가

가 , Bt 가 가
가 , .

pot , , ,
 , ,

가 ,
 .

가 , , ,
 .
가
()

가 Baculovirus

, Baculovirus
Baculovirus

, Baculovirus

,

가

가

가

,

,

,

가

가

(2) 2 :

15 random anecdotal

(60)

3

2

60%

60

2

,

(, ,)

	(ppm)	
	5,000	90
,	5,000	30
,	5,000	30
	5,000	30
	5,000	30

*Primary screening 5,000 ppm ,

(hexane, chlorform, ethyl acetate, water)

column

chromatography, , spectral techniques, (GC- MS, IR, UV, 1H
C- NMR)

mouse 48

Salmonella

Ames Maron(1982)

(,)

(, ,)

1

2

Bt

3

:

2 Bt

1

, 가

Bacillus thuringiensis (Bt)

Bt

가

,
가 가 Bt

1960 Bt 가

800 - 1,000

, 92 2

10% 가 Bt

Bt가 , Bt가 ,

, 가 ,

, 가

, Mycogen () 57 Bt

, IRRI () 3,000 Bt ,

가 Bt

가 Bt

Bt

Bt

1989 Bt 가 가 .

가

Bt 가 1.1% (38 , 1995)

가

가 , ,

Bt . 가 가 ,

Bt가 ,

Bt 가

Bt .

Bt

Bt Bt . Bt

가 Bt

electroporation .

, Bt

Bt

80 2 400 89 1

7 11% 가 , 2,000

30%

가 . Bt

, 가

, (Thuricide, Dipel, Xentari)

Bt

Bt NT0423

가

Bt

2

1.

1) Bt

Bt type strain

. Bt

Ohba

가

Bt NTB-1

pCG-5 vector

Gill

2) PCR

primers

primers

Kalman (1993)

primers

. Cry type

, Cry type

, Cry type

, Cry type

, Cry type

Bt

. primers () Bioneer

3)

25 ± 1 ,

55 ± 10%

(*Spodoptera exigua*)

(*S. litura*)

(*Culex pipiens pallens*)

(*Apriona germari*)

(*Aphodius apicalis*)

- 20

Bt

2.

1) Bt

가, , , , ,

Ohba Aizawa (1978)

Bt

1

g

9 Mℓ 가 5

50 Mℓ

8

0 5

10-2 10-3

nutrient

agar

, 28

4-5

가 Bt

Bt

- 20

50 Mℓ conical tube

10Mℓ

tube 65

30 가

10-2 10-3

nutrient agar

Bt

2)

Bt

(Olympus Model VAN OX)

Bt slide glass, cover glass

emulsion 1,500 (Phillips

SEM 515)

, coating

3)

3 l GYS 가

Bt 28 160 rpm 4

0.01% Triton X-100 1 M NaCl

3, sucrose 67%, 72%, 79%, 87%

(Beckman SW28) 4,

80,000 g 14 (Wendy Ellar, 1983). 79% 87%

3 3

sucrose

4) DNA

Bt alkaline lysis (Birnboim, 1979)

Bt LB broth 28, 12

1, 250 M \emptyset SPY 28, OD \emptyset nm 0.7

5,000 g, 5 10

M \emptyset G.T.E [50 mM glucose, 25 mM Tris-Cl (pH 8.0), 10 mM EDTA]

1 M \emptyset lysozyme (50 mg/M \emptyset)

20 . 20 Mℓ NaS (0.2 N NaOH, 1% SDS)
 10 . 15 Mℓ 3 M potassium acetate
 60 Mℓ, glacial acetic acid 11.5 Mℓ, 28.5 Mℓ) , 5
 10,000 rpm 10
 isopropanol 1 Mℓ TE
 RNase A 10 μg/Mℓ 가 37 30

chloroform isoamylalcohol
 24 : 1
 2 100% -70 15 12,000 rpm
 15 70% 2
 100 μℓ TE

5) (SDS- PAGE)
 Bt GYS 28 , 4 - 5 ,
 1 M NaCl, 1 mM EDTA 3
 Laemmli (1970)
 5X Sample buffer [0.6 Mℓ 1 M Tris-HCl (pH
 6.8), 5 Mℓ 50% glycerol, 2 Mℓ 10% SDS, 0.5 Mℓ 2-mercaptoethanol, 1 Mℓ 1%
 bromophenol blue, 0.9 Mℓ H₂O] 100 5 가 ,
 , 10% SDS- PAGE

6)
 1 N NaOH (pH 12) 28 (0.4%

w/v) , 5 가 2.0 kg (Female, New Zealand White albino rabbit) 1 M ℓ freud's complete adjuvant 1 M ℓ multisite subcutaneous . 1 1 freud's incomplete adjuvant 2 booster , 1 . 10 3,000 g 30 , 0.001% methiolate 가 - 20 .

7)

33 Bt 1978 Ohba Aizawa (1). Bt LB (pH 7.4)가 Erlenmeyer 24 28 50 rpm PBS (phosphate buffered saline) . 0.25% formalin PBS , 37 1 , PBS . ICR mouse . freud's complete adjuvant , 7 3 freud's incomplete adjuvant , . 3 serum , 100 2 가 , serum - 20 . 56 30 .

8)

96 well plates

(Laurent , 1996). 2

8 50 rpm 8 - 10 Bt 100 $\mu\ell$ saline 50
 , 37 1
 . .

9) DNA

가 DNA DNA 3 μg
 16 $\mu\ell$, 10 mM EDTA가 1 N NaOH 4 $\mu\ell$ 가 37
 30 DNA . 2 $\mu\ell$ 3M Sodium
 acetate (pH 5.2) 가 50 $\mu\ell$ 가 -70 15
 , 15,000 rpm 10 가 DNA
 70% 2 3 , 7 $\mu\ell$

DNA dideoxy chain termination (Sanger , 1977)
 Sequenase[®] version 2.0 kit (United States Biochemical Co.) 가
 DNA 5 \times sequenase 2 $\mu\ell$, primer 1 $\mu\ell$ 가 65 2
 , 30 DNA primer annealing . 0.1 M DTT 1
 $\mu\ell$, labeling (1 : 4) 2 $\mu\ell$, ³⁵S]-dATP 0.5 $\mu\ell$ (10 $\mu\text{Ci}/\mu\ell$),
 sequenase (1 : 7) 2 $\mu\ell$ 가 5 labeling ,
 ddGTP, ddATP, ddTTP ddCTP 2.5 $\mu\ell$ 3.5
 $\mu\ell$ 37 5 (termination) . ,
 4 $\mu\ell$ 가 , 75 2 가 DNA
 loading .

(20 \times 40 cm) siliconization ,
 6% buffer-gradient polyacrylamide gel loading 1,700 V
 2 . 3 M 2

, 48 X-ray .

10) Bt PCR
Bt 28 , 12 - 18
100 $\mu\ell$ 가 1.5 M ℓ
eppendorf tube 10 ,
10,000 rpm 10 PCR
4 .

11) Polymerase Chain Reaction (PCR)

Bt plasmid DNA
primer PCR . PCR reaction mixture
() Bioneer Primix TopTM . DNA Thermal Cycler
(Perkin Elmer Cetus) 94 , 45 (denaturation), 45 55 , 1
(annealing), 72 , 1 2 (polymerization) 35 cycle .
3% agarose gel
DNA .

12) Bt
Bt NT0423 28
, 25 M ℓ (3 :
2) 500 M ℓ , 30 150 rpm
, 3 l 가 5 l
(Braun Co.) 5% , 30% pO₂ 28 , 200 rpm

13) Bt

(HIMAC CR20B2, Japan) 4 , 6,000 rpm,
20 가
, (6 kg/cm2)
. 가 49, 50, 51
.

14)

polyoxyethylene alkyl aryl sulfate, sodium
naphthalene sulfonate formaldehyde condensate, modified aromatic sulfonate, sodium
dialkyl sulfosuccinate, sodium benzoate . white carbon,
Tixolex- 25 , kaoline , sucrose .

15) Bt

Bt 80 , 10 ,
, 28 24
, .

16)

GYS 30 , 150 rpm 4- 7
.
, , 1
.

Bt

10

cm Bt 가 .
Bt 20 Mℓ
3 Bt
가 60 .

3

1.

1) Bt

가

353 Bt

3

1

37 Bt

2

10

3

7

7 STB- 1, STB- 2, STB- 3, STB- 4, STB- 5, STB- 6, STB- 7

. 3 STB- 1, STB- 3, STB- 6, STB- 7 4 100%

, STB- 2, STB- 4, STB- 5 80% .

SDS- PAGE

cryIA(a), *cryIA(b)*, *cryIC*,

cryIE, *cryIF* oligonucleotide primers

cryII *cryV* oligonucleotide primers PCR

gene type . 100%

33 STB-1 H3a3b

Bt subsp. *kurstaki*, STB-3 H4a4c Bt subsp. *kenyae* , STB-6,
 STB-7 Bt subsp. *aizawai*

가 가 (1).

SDS-PAGE

130 kDa 65 kDa . PCR STB-1

cryIA(a), *cryIA(b)*, *cryIA(c)*, *cryIE*, *cryII*, STB-3 *cryIE*, STB-4 *cryIA(b)*,
cryII, STB-6, STB-7 *cryIA(a)*, *cryIA(b)*, *cryIC*, *cryIF*, *cryII* 가

(1).

PCR 4 STB-1 *cryIA(a)*, *cryIA(b)*, *cryIA(c)*

cryIE 가 *Bt* 가

STB-3 Bt subsp. *kenyae*

.

Bt subsp. *kurstaki* Bt subsp. *kenyae*

(3).

Table 1. H agglutination test of *B. thuringiensis* STB isolates toxic to *Spodoptera* species

H serotype	Serovar	Isolate			
		STB- 1	STB- 3	STB- 6	STB- 7
1	<i>thuringiensis</i>	-	-	-	-
2	<i>finitimus</i>	-	-	-	-
3a	<i>alesti</i>	-	-	-	-
3a3b	<i>kurstaki</i>	+	-	-	-
4a4b	<i>sotto</i>	-	-	-	-
4a4c	<i>kenyae</i>	-	+	-	-
5a5b	<i>galleriae</i>	-	-	-	-
6	<i>entomocidus</i>	-	-	-	-
7	<i>aizawai</i>	-	-	+	+
8a8b	<i>morrisoni</i>	-	-	-	-
8a8c	<i>ostriniae</i>	-	-	-	-
8b8d	<i>nigeriensis</i>	-	-	-	-
9	<i>tolworthi</i>	-	-	-	-
10	<i>darmstadiensis</i>	-	-	-	-
11a11b	<i>toumanoffi</i>	-	-	-	-
11a11c	<i>kyushuensis</i>	-	-	-	-
12	<i>thompsoni</i>	-	-	-	-
13	<i>pakistani</i>	-	-	-	-
14	<i>israelensis</i>	-	-	-	-
15	<i>dakota</i>	-	-	-	-
16	<i>indiana</i>	-	-	-	-
17	<i>tohokuensis</i>	-	-	-	-
18	<i>kumamotoensis</i>	-	-	-	-
19	<i>tochigiensis</i>	-	-	-	-
20a20b	<i>yunnanensis</i>	-	-	-	-
20a20c	<i>pondicheriensis</i>	-	-	-	-
21	<i>colmeri</i>	-	-	-	-
22	<i>shandongiensis</i>	-	-	-	-
23	<i>japonensis</i>	-	-	-	-
24	<i>neoleonensis</i>	-	-	-	-
25	<i>coreanensis</i>	-	-	-	-
26	<i>silo</i>	-	-	-	-
27	<i>mexicanensis</i>	-	-	-	-

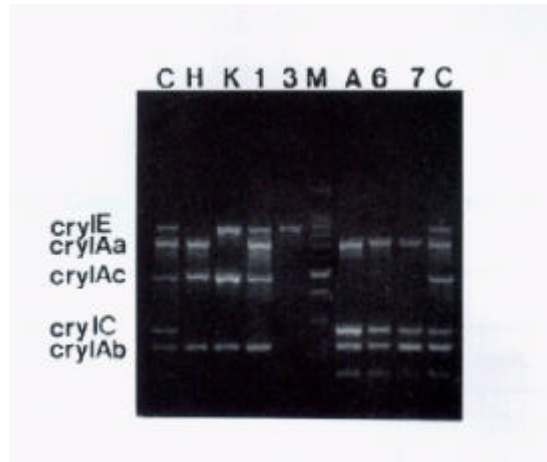


Fig. 1. PCR Products of STB series using *Spodoptera* specific primer sets

가

Bt , , , SDS-PAGE, plasmid DNA

4

Bt Ag10, Aa18, Ag21, Aa22 . Aa18 Aa22

Ag10

Ag21 . 33

Aa22 Bt subsp. *darmstadiensis*

3

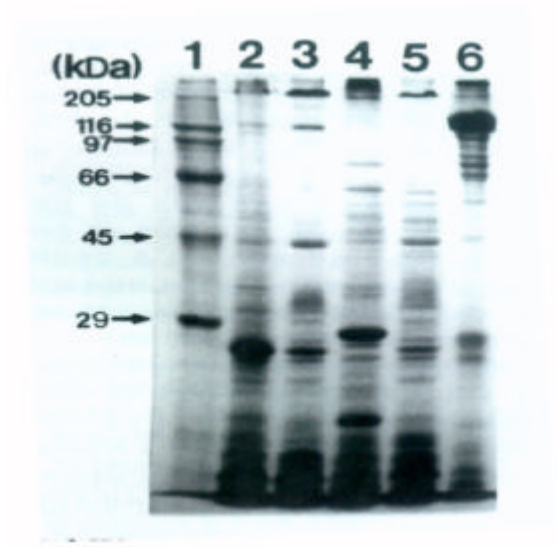


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of selected *B. thuringiensis* isolates.
 Lanes: 1. Molecular weight marker; 2, Aa18; 3, Ag21; 4, Aa22; 5, Ag10;
 6, *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis*.

가
 Bt
 329 Bt
 (Culex
 pipiens pallens)
 가 41 .

Table 2. Isolation and toxicity of *B. thuringiensis* from forest resources

	<i>B. mori</i>	<i>C. pipiens pallens</i>	<i>B. mori</i> and <i>C. pipiens pallens</i>	Coleoptera	Non-toxic	Total
Isolates			154 (46.8%)			329
No. of Bt. isolates	69	1	41	-	4	115
Distribution rate(%)	60	0.9	35.5	-	3.6	100

2)

			Bt			
	3		PCR		Bt	2
Bt subsp. <i>kurstaki</i>	HD-1		subsp. <i>kenyae</i>			
Bt	GYS		5		autolysis	
	(3).			106 cfu/ml	
STB- 1	100%				가	
Bt subsp. <i>kurstaki</i>					109 cfu/ml	
	STB- 1	STB- 3		52.5%	50%	
Bt subsp. <i>kenyae</i> 가		55%				

Bt subsp. *kurstaki*가
 가 , 가 *Bt* subsp. *kurstaki* ,
 STB-1 ,

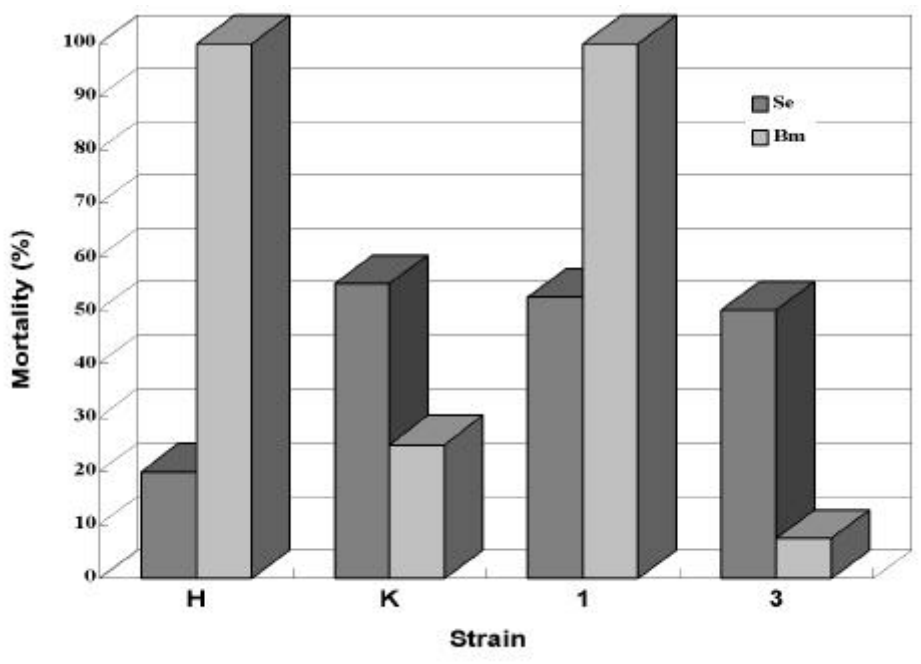


Fig. 3. The toxicities of STB-1 and STB-3 against *S. exigua* and *B. mori*

3) Bt
 Bt Bt
 electroporation
 , 가

가

Bt NTB-1 Bt
subsp. *israelensis* 가

cryIVD *cytA* electroporation

SDS-PAGE, western blot

Bt subsp. *israelensis*

Bt NTB-1 CryIVD CytA 가

pCG5 electroporation , 5

western blot , wild type 가

가 72 kDa CytA

Bt subsp. *kurstaki* Cry-B pCG5가

pCG5가 wild type Bt subsp. *morrisoni* PG-14

CryIVD CytA가 . CryIVD CytA

polyclonal antibody wetern blot .

Bt NTB-1

NTB-1 CryIVD, CytA (4).

, CytA

1.3 μ m inclusion , wild type

. Bt NTB-1

B. t. subsp.

morrisoni PG-14 , 10⁵CFU/ml *B. t.* subsp.

kurstaki Cry - B pCG5가 , 10⁶ cfu/ml

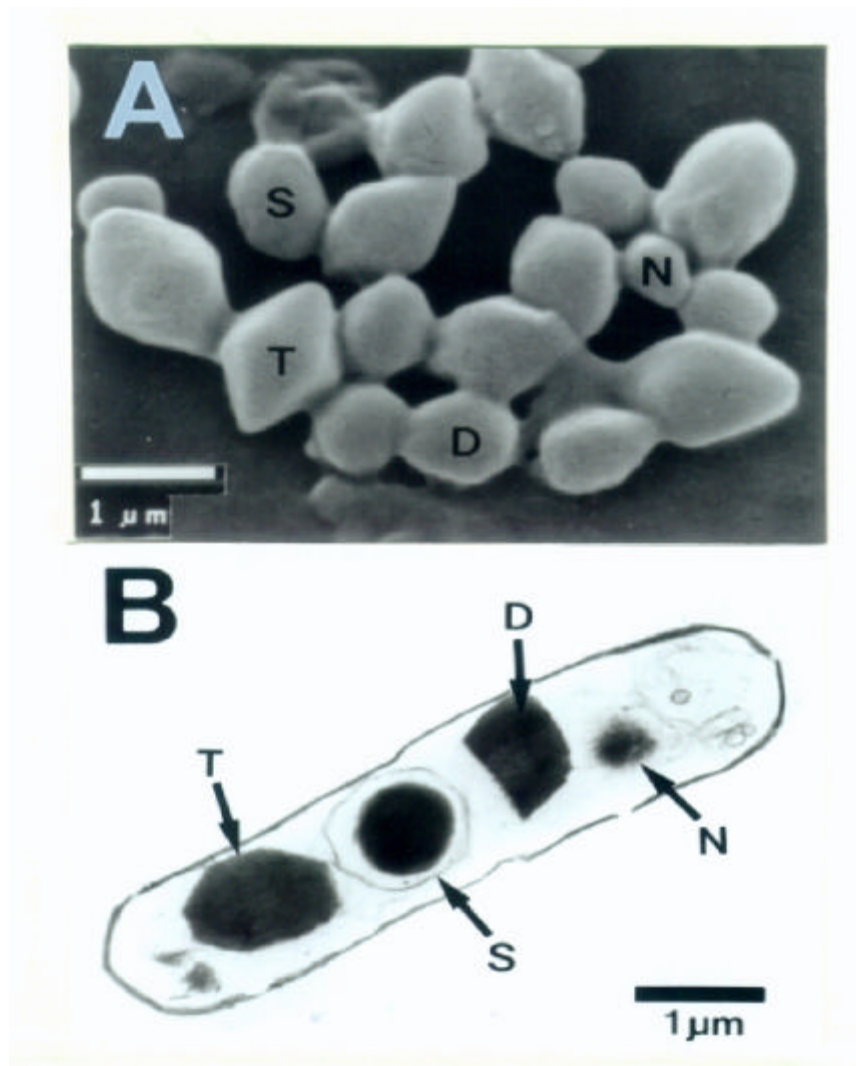


Fig. 4. Parasporal inclusion proteins of *B. thuringiensis* NTB-1 transformed with pCG5 observed by scanning electron- (A) and transmission electron- (B) microscopy. CryIVD, CytA, NTB-1 crystal protein and spore are represented as D, T, N and S, respectively.

wild type

Bt subsp. *morrisoni* PG-14

(5).

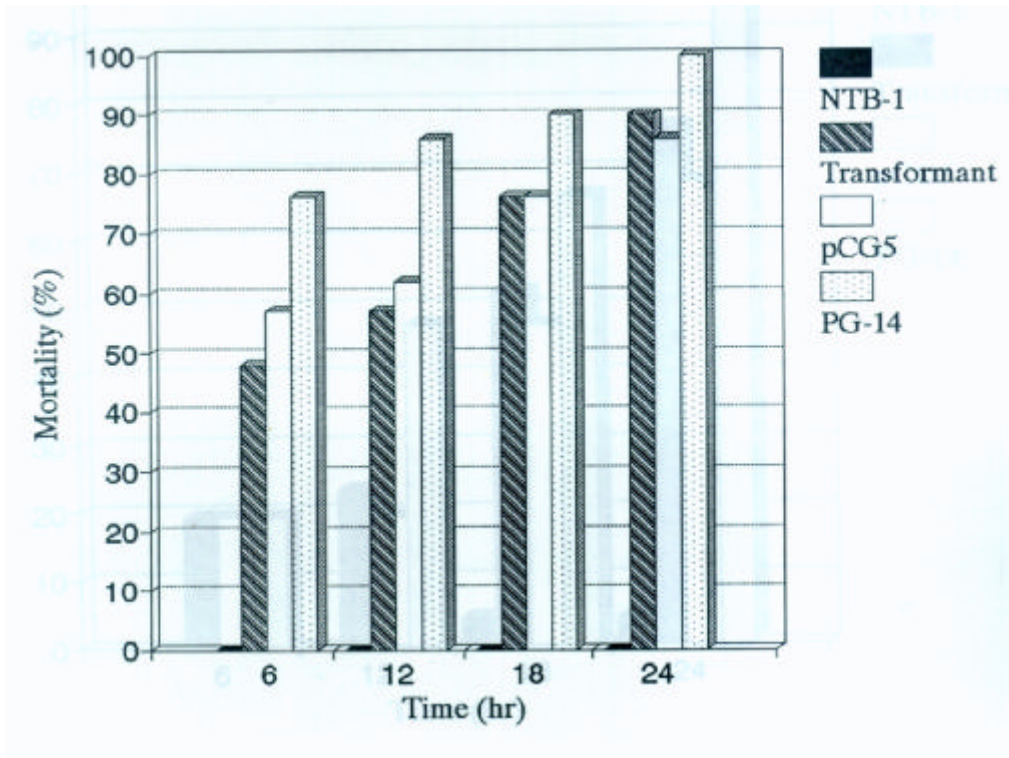


Fig. 5. Mosquitocidal activity of *B. thuringiensis* NTB-1 transformed with pCG5 against *Culex pipiens pallens* at 10^6 CFU/ml

2. Bt

1) Bt

(1)

/

Bt NT0423	가	. Bt NT0423	GenBank
(Acc. No. U82003).	, sporulated cell	free spore	total
cell NB agar plate	'drop method'	colony forming	
unit (CFU)	, spore	65	15
NB agar plate	colony		.
3		3	
9 plate	colony	.	

(2) Bt

sugar, glucose, maltose	yeast extract, casein, peptone
가 Bt 4	
. sugar 가 Bt 가 ,	
가 casein 가가 가 .	

2)

(1)

Bt	가
. Bt	ammonium phosphate
dextrose	,

,
가
84.1% , 가

1 : 1, 1 : 4, 2 : 3, 3 : 2 4 : 1 5
SW Bt
GYS
LB Bt
(3). 가 Bt GYS LB
5 가
pH, 가 , 3 : 2

(3). SW32 1
, 72 96
(6).

Table 3. Comparison of growth and sporulation in SW and known media

Medium	Initial pH	Final pH	Cell count		OD600nm	
			No. of Cell	No. of Sporea		
GYS	7.0	6.7	8	-- b	2.791	
LB	7.0	7.8	42	-- c	3.341	
Soybean : Wheat						
1 : 1 (SW11)	Mixture	7.0	7.5	28	22	3.342
1 : 4 (SW14)	Mixture	7.0	7.5	26	14	3.348
2 : 3 (SW23)	Mixture	7.0	7.3	43	1	3.348
3 : 2 (SW32)	Mixture	7.0	7.3	2	37	3.348
4 : 1 (SW41)	Mixture	7.0	7.6	9	19	3.348

* Incubation condition; 30 °C, 240 rpm, 5 days

a Spore number is calculated after heat treatment (85 °C, 10 min)

b and c Could not observed colony until x 10⁶ CFU/ml

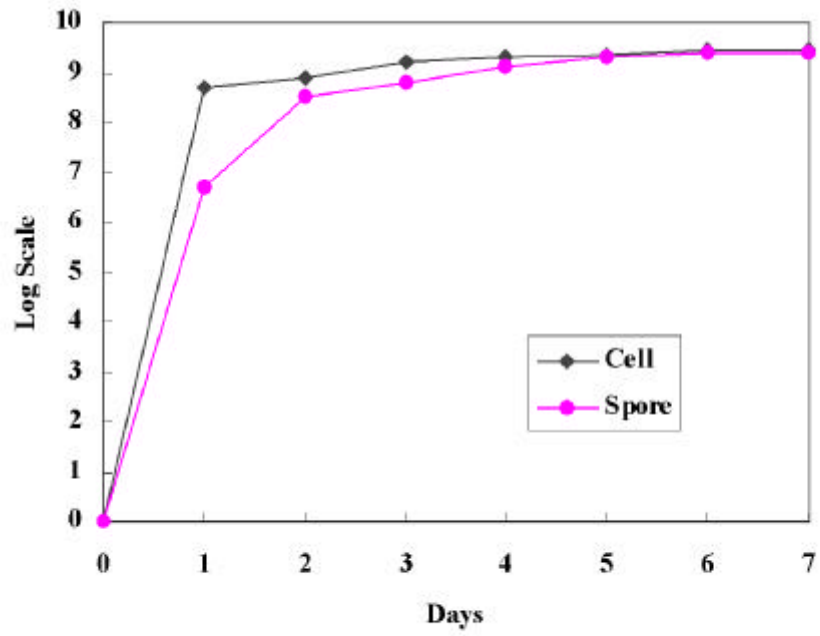


Fig. 6. Growth curve of viable cells and spores of *B. thuringiensis* in the SW32 medium

Bt

4% 5%

가

9

(7).

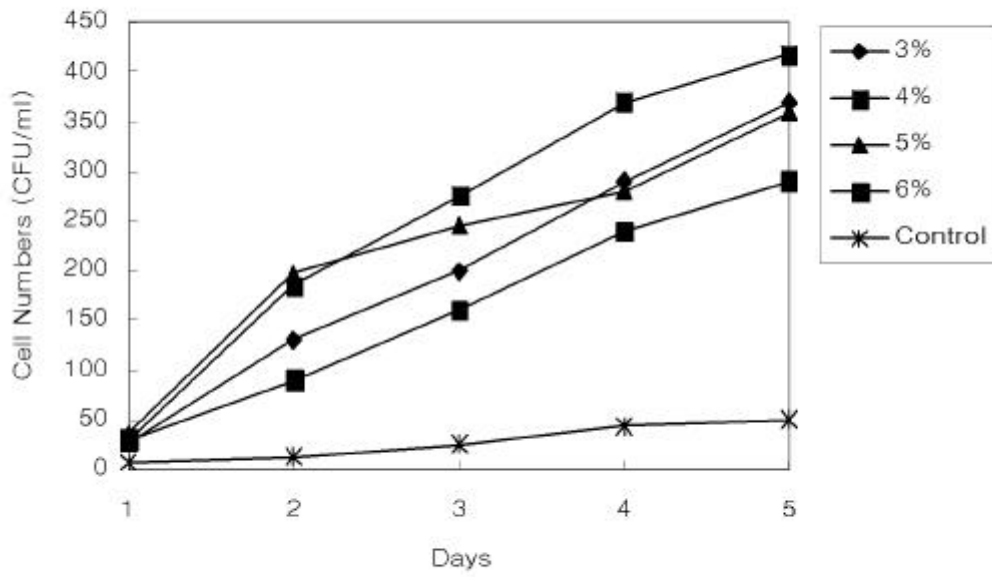


Fig. 7. Determination of the optimum volume (%) of the medium in a fermentor

0:5 5:0

5

3:2

4x10⁹/ml 가

pH

3)

Bt spore colony count
 4x10⁹/ml , 1.3x10⁹/ml
 5 , 7

4)

Bt
 glucose 가
 , 가 50 L
 Bt

(1)

Bt
 cotton seed meal, soybean meal, corn steep liquor
 molasses 가
 가 glucose 가
 2% (w/v) 3% (w/v)
 1.0 vvm 200 rpm Bt (. 8)
 8 가 12 1.2 x 10⁹
 CFU/mL 가 가 48

이후부터는 급격히 감소하는 경향을 보였다. 반면 포자의 형성은 배양 48시간부터 증가하기 시작하여 배양 3일째인 74시간에서 최대의 포자수를 보였다. 그러나 최대 포자수인 6.5×10^8 CFU/mL은 54.2%의 영양세포만이 포자로 전환되었을 뿐 나머지의 영양세포들은 포자로 전환되지 못하고 사멸된 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 배지내의 용존산소량이 낮았기 때문인 것으로 사료되었는데, 영양세포의 수가 최대를 보였던 배양 12시간 이후부터 용존산소량이 급격히 감소하기 시작하여 포자수가 증가하는 48시간에서는 용존산소량이 포화용존산소량의 20% 이하로 떨어진 점이 그 가능성을 뒷받침 해주고 있다. 일반적으로, Bt는 호기성 세균으로서 세포의 성장 및 포자형성에 높은 수준의 용존산소량이 필수적인 것으로 알려져 있기 때문에 본 균주의 경우에도 높은 농도의 산소를 공급하면서 배양해야 할 것으로 사료되었다. 한편, 배양중의 pH는 배양초기에 5.5까지 감소하다가 배양 24시간 이후부터 다시 증가하기 시작하여 배양 96시간에는 pH가 8.4까지 증가하였다.

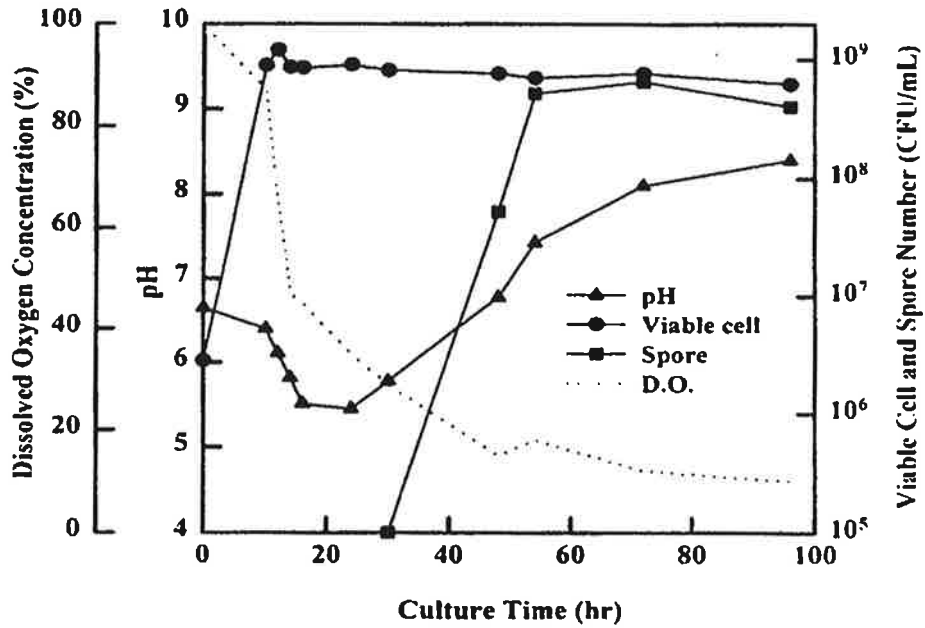


Fig. 8 Profiles of viable cell and spore number, pH, and dissolved oxygen concentration during the batch culture of *B. thuringiensis* in an industrial medium.

Salama 등의 연구결과에 따르면 pH가 5.5 미만으로 떨어졌을 때에는 세포의 성장 및 포자형성을 저해한다고 알려져 있기 때문에 본 실험의 경우에도 배양과정에서의 pH를 7.0으로 일정하게 유지시켜야 될 것으로 사료되었다.

(2) glucose 가

Bt

가

1.0×10^{10} CFU/mL

, C/N ratio ,

가

. Goldberg

가

가

830% 가

0.04 g/L

CaCl₂ · 2H₂O, 0.3 g/L MgSO₄ · 7H₂O, 0.04 g/L MnSO₄ · 4H₂O, 0.3 g/L K₂HPO₄

가

9

가

Bt

9

가

가

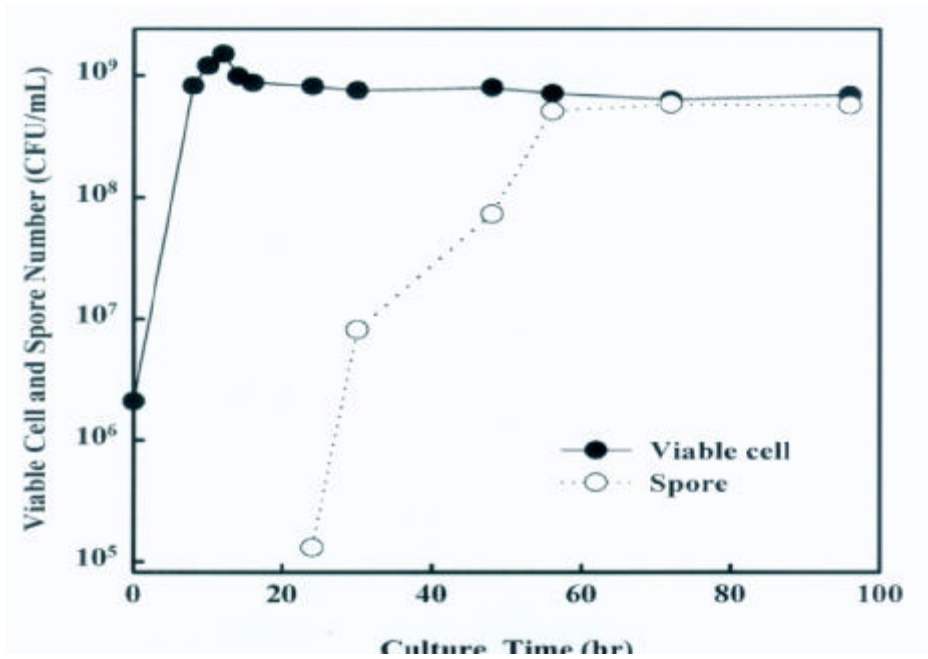


Fig. 9 Profiles of viable cell and spore number during the batch culture of *B. thuringiensis* with the addition of mineral salts.

glucose 10 g/L 가
 (Fig. 10) 가
 가 9.9×10^8 CFU/mL 4.9×10^8 CFU/mL glucose가 가
 1.2×10^9 CFU/mL 6.5×10^8 CFU/mL

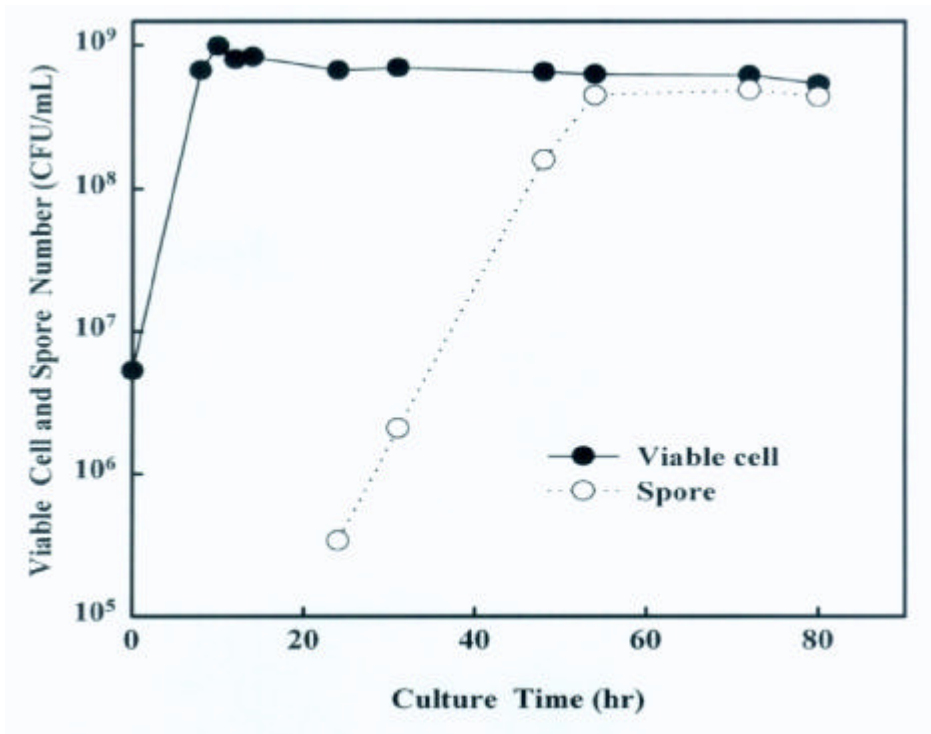


Fig. 10 Profiles of viable cell and spore number during a batch culture of *B. thuringiensis* with the addition of 10 g/L glucose.

glucose 가 ,
glucose

(3)

50% 60%
1.0 vvm
200 rpm 400 rpm
, 400 rpm
50%
11 16 1.8×10^9 CFU/mL
72 1.1×10^9 CFU/mL
61.1% 8
가 16 가 16
24 가 54
가 가 72
60% 50%
11 22% 가 2.2×10^9 CFU/mL
, 72 73% 가 1.9×10^9 CFU/mL
86.4% 가
가
가
Yousten *B. sphaericus*
toxicity가
60% foam

성장이 급격히 증가하는 exponential phase에서 60% 이상의 용존산소량을 일정하게 유지하는 것이 어려웠기 때문에 과량의 산소에 의한 포자형성의 저해효과는 확인할 수 없었다.

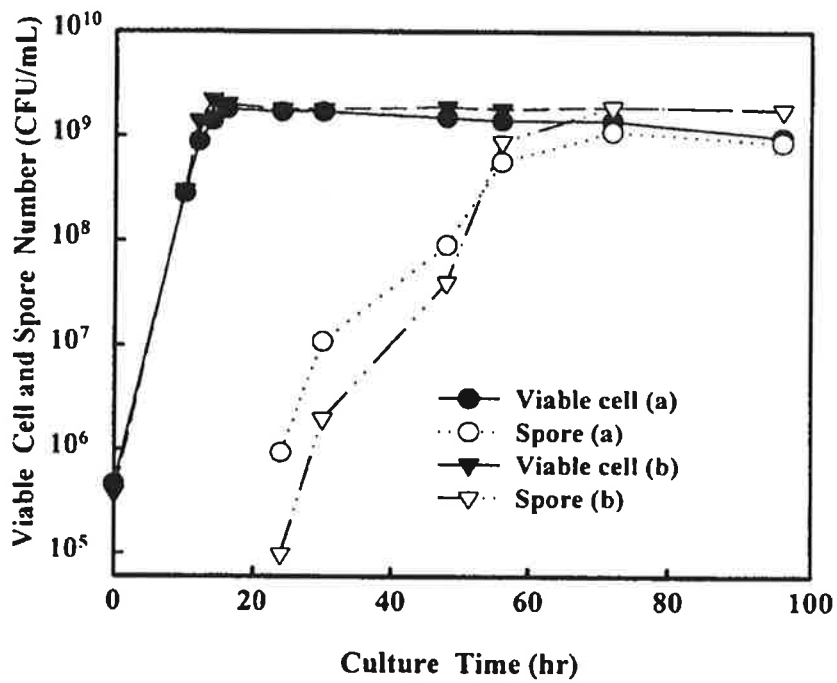


Fig. 11 Profiles of viable cell and spore number during the batch culture of *B. thuringiensis* under dissolved oxygen concentration of 50% (a) and 60% (b) of that at saturation.

(4) Bench-scale

Bt 가 50 L ()
50 L 30 L pH 7.0
가 가
(12). 0.75 vvm 250 rpm
24 1.3×10^9 CFU/mL
96 2.5×10^8 CFU/mL
19.2% . ,
24 96 .
1.0 vvm 400 rpm 가
가 2.5×10^9 CFU/mL 2.2×10^9 CFU/mL 88% .
가
가 . 12
, 72 , 0.75 vvm
250 rpm

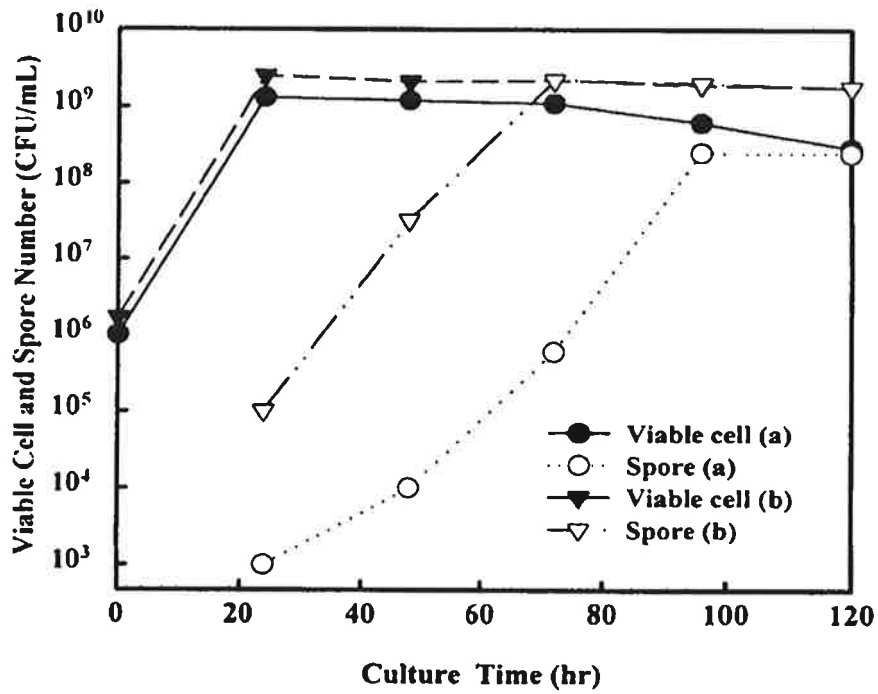


Fig. 12 Profiles of viable cell and spore number during the bench-scale batch culture of *B. thuringiensis* in different aeration rate and agitation speed.

(a) : aeration rate of 0.75 vvm and agitation speed of 250 rpm

(b) : aeration rate of 1.0 vvm and agitation speed of 400 rpm

3.

1) 가

, 가 , ,
1 . Bt NT0423
5 .
pH NaOH 7.0 30% ,
28 , 200 rpm ,
antifoam agent 가 . 5
1 X 10¹⁰ cell/ml 가
(BioBact) . 10% , 20% ,
40% . Bt 가 10%
M₀ 5 X 10⁹ - 1 X 10¹⁰ 가 Bt
polyoxyethylene alkyl aryl sulfate sodium naphthalene sulfonate formaldehyde
condensate가, white carbon, sucrose,
kaoline formulation I, II, III ()
4), , , 가
. Formulation I white carbon 가 ,
formulation II 1 40 . formulation III ,
white carbon , 11 , (particle size) 11 μm가 99% ,
44 μm 1% 가 (4).
BioBact 10% Bt 가 가 BioBact 20% 40%
(5). pH 20 5.9 가
Bt . 3

Table 4. Selection of 10% Wettable Powders with *B. thuringiensis* strain NT0423

Component	Formulation I	Formulation II	Formulation III
<i>B. thuringiensis</i>	10%	10%	10%
Surface active agent (A)	7%	7%	7%
Surface active agent (B)	-	-	3%
White Carbon	15%	10%	5%
Sucrose	5%	5%	5%
Kaoline	63%	68%	80%

* Confirmed with Formulation III

* Surface active agent (A) : NK-NX 150

* Surface active agent (B) : NK-PX 100

Table 5. Formulation of BioBact 20% and 40% wettable powders

Component	Amount (%)	
	20 % W.P	40 % W.P
<i>B. thuringiensis</i> tech. powder	20	40
Surface active agent (A)	7	8
Surface active agent (B)	2	2
Stabilizer (C)	7.5	15
Stabilizer (D)	7.5	15
Carrier	56	30
Total	100	100

A. NK-NX250L : Polyoxyethylene alkyl aryl sulfate,

Modified aromatic sulfonate

B. NK-EPB100 : Sodium dialkyl sulfosuccinate, sodium benzoate

C. White carbon

D. Tixolex- 25

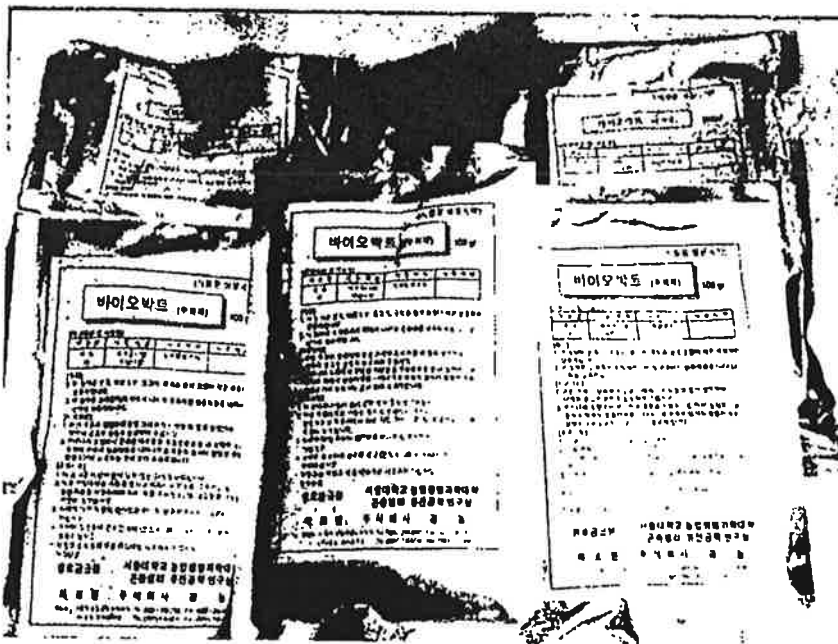


그림 13. 제제화에 이용된 Bt NT0423 균주의 전자현미경사진 (S, 포자; C
내독소단백질)과 시제품 (BioBact)



그림 14. 야외배추포장에서의 실증실험

4.

1) ()

10,000 2-3 , petri- dish 100 -
3 10 2
Bt *kurstaki* type, A Bt *aizawai* type, B
C , Bt NT0423
BioBact 20% 40% A, B 100%
, BioBact 10% (6).
NT0423 107 CFU/ml 0.005 g/ml
2 , 가

2) (14)

, 40
100 1,000 100 Mℓ . 1
, 12 가 3 10
, 2 , 3 , 7
A, B C , NT0423
가 Polyoxyethylene alkyl aryl sulfate 7%, Sodium dialkyl

sulfosuccinate, Sodium benzoate 2%, White carbon 7.5%, Tixolex-25 7.5%, Kaoline 56%, 20% BioBact 20% , Polyoxyethylene alkyl aryl sulfate 8%, Sodium dialkyl sulfosuccinate, sodium benzoate 2%, White carbon 15%, Tixolex-25 15%, Kaoline 30%, 40% BioBact 40%

(5). 2가 Bt *aizawai* type

(B) Bt *kurstaki* type (A)

		B	1,000	90%
, A	1,000	50%		BioBact 20%
1,000	70%	, BioBact 40%	1,000	85%

Table 6. Efficacy of Bt formulations on diamondback moth¹ in cabbage
under laboratory condition

Formulation	Amount (g) / ml	Dead larvae / 10 larvae				Mortality ² (%)
		24 hr		48 hr		
I. B product (<i>aizawai</i> type)	0.0125	9	9	1	1	100
	0.025	7	8	3	2	100
	0.005	8	10	2	0	100
II. A product (<i>kurstaki</i> type)	0.0025	10	7	0	3	100
	0.005	9	9	1	1	100
	0.01	10	9	0	1	100
III. BioBact - 10% WP	0.04	4	2	6	7	90
	0.1	2	8	5	1	80
	0.2	9	4	1	4	80
IV. BioBact - 20% WP	0.0025	6	6	4	4	100
	0.005	7	8	3	2	100
	0.01	6	7	4	3	100
V. BioBact - 40% WP	0.0025	7	6	3	4	100
	0.005	7	7	3	3	100
	0.01	8	9	2	1	100
VI. NT0423 culture	106 CFU/ml	2	5	0	0	70
	107 CFU/ml	1	0	4	5	90
	108 CFU/ml	6	3	2	5	100

¹ *Plutella xylostella*, third instars

² Diamondback moth larvae were placed in petri-dishes containing cabbage foliage from treated plants

Table 7. Efficacy of BioBact against DBM on cabbage in field condition

Treatment	Dilution factor	Toxicity	
		Mean (%)	Standard Error
C product (Chemical)	1/1,000	21.00	2.36
B product (<i>aizawai</i> type)	1/1,000	90.58	3.96
A product (<i>kurstaki</i> type)	1/1,000	50.00	5.39
BioBact 20%	1/100	85.42	5.05
BioBact 20%	1/1,000	69.89	3.96
BioBact 40%	1/100	89.36	3.53
BioBact 40%	1/1,000	84.82	3.61
NT0423 Culture	107 CFU/ml	88.80	4.97
NT0423 Culture	106 CFU/ml	82.80	4.57

* Used the SAS System

5.

1)

Bt NT0423		BioBact 10%, BioBact 20%, BioBact 40%
	Bt	A (Bt ssp. <i>kurstaki</i> type) B (Bt ssp. <i>aizawai</i>
type)	SDS- PAGE	(15). 5 Bt
130- 140 kDa		가
		가
		BioBact가
Bt NT0423		.

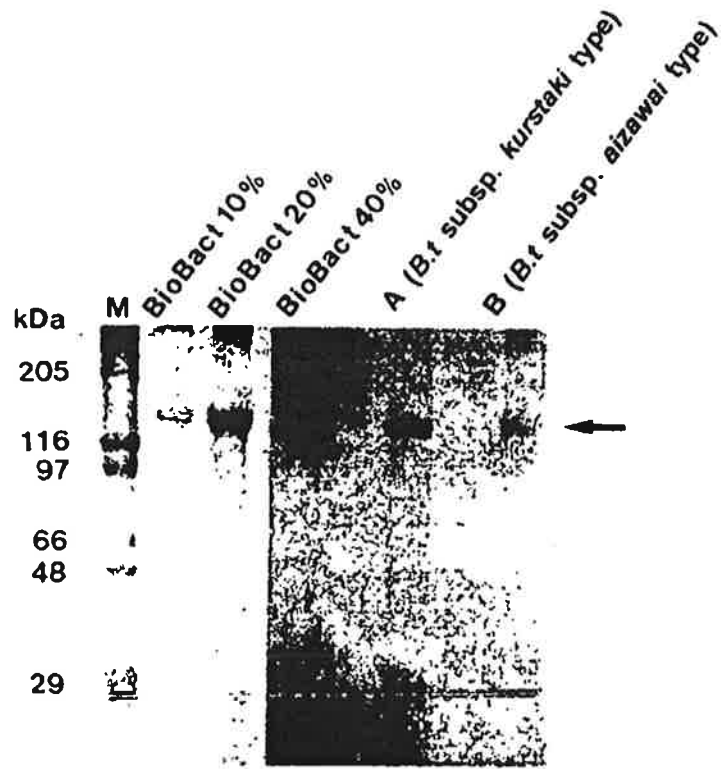


Fig. 15. SDS-PAGE analysis of 5 *B. thuringiensis* formulation

2)

1993

. ,

1990

McGuire Shasha . Slide glass
3 2 0.5 g dry oven slide
glass 2 40 ml 1 . 2

. ,

1990 McGuire Shasha . Slide
glass 3 2 (A, B) 0.5 g dry
oven slide glass 2 40 ml 1

. 2

(16).

20% 40% 가

, A B

.

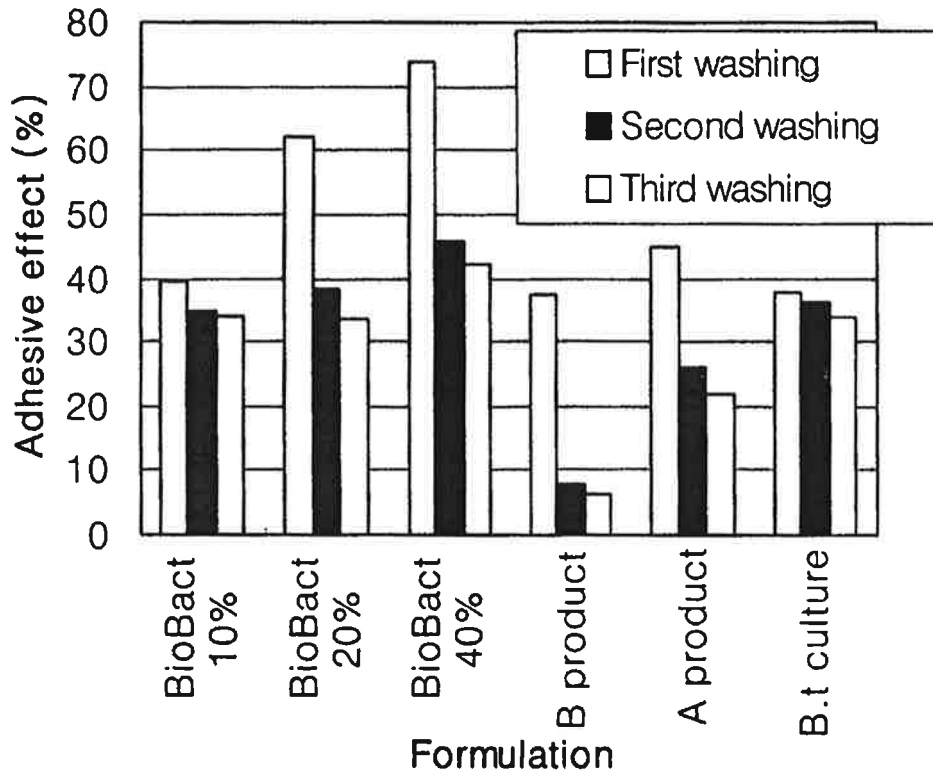


Fig. 16. Comparison in adherence to slide glass depending on formulations of BioBact and commercial Bt products

6.

1)

, SW32

3 2

(8).

30 24

BioBact 20% 40% 가

Table 8. Number of spores in *B. thuringiensis* formulations

Formulation	Number of spore
BioBact 10% WP	2.5 X 10 ⁶ /mg
BioBact 20% WP	4.5 X 10 ⁸ /mg
BioBact 40% WP	5 - 9.5 X 10 ⁸ /mg
B product (<i>aizawai</i> type)	5 - 7 X 10 ⁸ /mg
A product (<i>kuistaki</i> type)	3 X 10 ⁷ /mg

2)

40%, 2, , *Bt* NT0423 3 7 BioBact 20% 가
(9). 3
3 20 72
. 7 ,
2 , *Bt* NT0423 BioBact 20% 40%
가
.

Table 9. Persistence effect of several formulations in field assay

Treatment	Dilution factor	Toxicity							
		3 days				7 days			
		dead(live)		Total	dead(live)		Total		
C product (Chemical)	1/1000	2(8)	3(5)	1(4)	6	2(8)	1(7)	0(7)	3
B product	1/1000	6(4)	4(0)	-	10	0(10)	5(5)	5(5)	5
A product	1/1000	7(3)	3(0)	-	10	0(10)	1(9)	2(7)	3
BioBact 20% - 1	1/100	9(1)	1(0)	-	10	10	0	-	10
BioBact 20% - 2	1/1000	0(10)	7(3)	3(0)	10	2(8)	7(1)	1(0)	10
BioBact 40% - 1	1/100	10	-	-	10	9(1)	1(0)	-	10
BioBact 40% - 2	1/1000	5(5)	3(2)	1(1)	9	4(6)	4(2)	1(1)	9
NT0423 Culture	107	4(6)	4(2)	2(0)	10	1(9)	3(6)	0(6)	4
NT0423 Culture	108	10	-	-	10	5(5)	4(1)	0(1)	9
Untreated	-	0(10)	2(8)		2	0(10)	-	2(8)	8

7.

bioassay, *Bt* products, BioBact 3, Xentari 3, 5 g, 4, 20, 30, 2, 4, 8

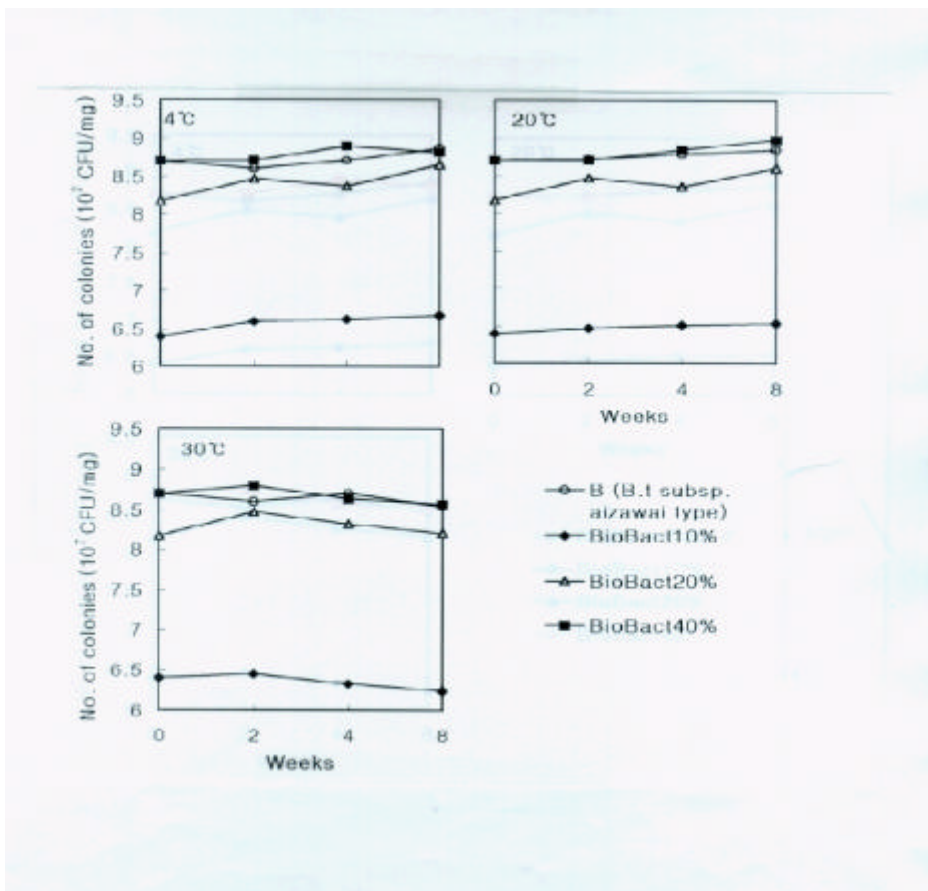


Fig. 17. Change in total number of viable cells and endospores of *B. thuringiensis* products during storage at 4 , 20 and 30

가 4 20 , 30 8
, Bt 가 Bt

8.

Bt BioBact[®] Bt

BioBact GenBank (Acc. No. U82003)
가 , Bt

9.

1 , 2

4

가

353 Bt

3

. 1 37 Bt , 2 , 3

7 . STB- 1, STB- 2,

STB- 3, STB- 4, STB- 5, STB- 6, STB- 7 . 3 STB- 1,

STB- 3, STB- 6, STB- 7 4 100% , STB- 2, STB- 4, STB- 5 80%

. 100%

33

STB-1 H3a3b Bt subsp.
kurstaki, STB-3 H4a4c Bt subsp. *kenyae* , STB-6, STB-7 Bt
 subsp. *aizawai* . bipyramid
 SDS- PAGE 130 kDa

65 kDa

cry primer PCR STB-1
cryIA(a), *cryIA(b)*, *cryIA(c)*, *cryIE*, *cryII*, STB-3 *cryIE*, STB-4 *cryIA(b)*,
cryII, STB-6, STB-7 *cryIA(a)*, *cryIA(b)*, *cryIC*, *cryIF*, *cryII* 가

. PCR 4 STB-1 Bt subsp.
kurstaki 가 STB-3 Bt subsp.
kenyae .

. STB-1
 , 100% 가 Bt subsp.
kurstaki 52.5%

Bt subsp. *kenyae*가 55%

Bt 가
 Bt 4 , Ag10, Aa18, Ag21, Aa22 .
 Aa22 Bt subsp. *darmstadiensis* 3

가

329 Bt

, 가 41 .

Bt

Bt

electroporation

Bt NTB-1

Bt

subsp. *israelensis*

가

cryIVD *cytA*

5

SDS- PAGE

wild type

가 가

72 kDa

CryIVD 20 kDa CytA

CryIVD CytA polyclonal antibody

western blot

. Bt NTB-1

Bt NTB-1

CryIVD, CytA

CytA

1.3µm

inclusion

, wild type

. Bt NTB-1

Bt

Bt NT0423

가

5

SW(

)

Bt

가 Bt

GYS LB

:

3 : 2

(SW32)

. SW32

Bt

1

72

96

4% 5% 가 .
7 spore colony count
Bt 4-5 4
×10⁵/ml , 1.3×10⁵/ml .
5 , 7

3% (w/v) 2% (w/v)
1.0 vvm 200 rpm Bt
Bt
pH 5.5 가 24
가 96 pH가 8.4 가
pH 7.0 .

가 , 가

Bt
g/L 가 , glucose 10
가
가 glucose가 가
glucose
가
glucose .

50% 60%
, 50% 8 가

16 가 16
 . , 24 가 54
 가 가 72
 . 60%
 50% 22% 가 , 72
 73% 가
 86.4% 가 .
 가
 Bt 가 50 L 30 L
 pH 7.0
 가 가 .
 1.0 vvm 400 rpm 가
 2.5×10^9 CFU/mL 2.2×10^9 CFU/mL 88% 12
 , 72
 .
 1 Bt NT0423
 5
 1×10^{10} cell/ml 가
 (BioBact) . 10% ,
 20% , 40% . Bt 가 10%
 MØ 5×10^9 - 1×10^{10} 가 Bt
 polyoxyethylene alkyl aryl sulfate sodium naphthalene sulfonate
 formaldehyde condensate가, white carbon, sucrose,
 kaoline formulation I, II, III

formulation III . Formulation white carbon ,
 11 , (particle size) 11 μm 가 99%, 44 μm 1% 가
 BioBact 10% Bt 가
 가 BioBact 20% 40% pH 2
 0 5.9 가 Bt .
 3 , ,

BioBact 20% 40%
 A (Bt subsp. *kurstaki* type), B (Bt subsp. *aizawai* type) 100%
 가 .
 BioBact 20% 1,000 70% ,
 BioBact 40% 1,000 85% A (Bt
kurstaki type), B (Bt *aizawai* type) .

Bt NT0423 BioBact 10%, BioBact 20%, BioBact 40%
 Bt A (Bt subsp. *kurstaki* type) B (Bt subsp.
aizawai type) SDS-PAGE 5 Bt
 130- 140 kDa 가
 가

BioBact가

Bt NT0423 .

BioBact 20% 40%가

, A B

BioBact

SW32

3

2

BioBact 20% 40%

가

BioBact 20%

40%,

A B,

, Bt NT0423

3

7

가

7

,

2

, Bt

NT0423

BioBact 20% 40%

가

,

Bt

가 4 20

, 30

8

, Bt 가

Bt

BioBact®

Bt

1

5

Bt

Bt

STB- 1, STB- 3

Bt NTB- 1

Bt NT0423, BioBact

BioBact

Bt Bt

, 80%

Bt

6

Adams, L. F., J. E. Visick, and H. R. Whiteley. 1989. A 20-Kilodalton Protein Is Required for Efficient Production of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* 27-Kilodalton Crystal Protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171 : 521-530.

Bai C., D. Degheele, S. Jansens and B. Lambert. 1993. Activity of insecticidal crystal proteins and strains of *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera exempta* (Walker). *J. Invertebr. Pathol.* 62 : 211-215

Bernhard, K., P. Jarrett, M. Meadows., J. Butt., D. J. Ellis, G. M. Roberts, S. Pauli, P. Rodgers, and H. D. Burges. 1997. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: Worldwide Distribution, Characterization, and Activity against Insect Pests. *J. Invertebr. Pathol.* 70 : 59- 68.

Birnboim, J. C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7 : 1513- 1523.

Bone, E. J., and D. J. Ellar. 1989. Transformation of *Bacillus thuringiensis* by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* 58 : 171- 178.

Chang, J. H., J. Y. Roh, Y. H. Je, H. W. Park, B. R. Jin, S. D. Woo, and S. K. Kang. 1998. Isolation of a strain of *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-1 encoding delta-endotoxin Cry1E. *Lett. Appl. Microbiol.* 28 : 387- 390.

Claus, D., and R. C. Berkeley. 1986. Genus *Bacillus* Cohn 1872, 174. In "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology." (P. H. A. Sneath, ed.), Vol.2, pp. 1105- 1141. Williams and Wilkins, Baltimore.

Cooksey, K. E., 1971. The protoxin crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*: Biochemistry and mode of action. In "Microbial Control of Insects and Mites."(H. D. Burges and N. W. Hussey, eds.). pp. 247- 274. Academic Press, London.

Couch, T. L., and Ignoffo, C. M. 1981. Formulation of insect pathogens. In

"Microbial Control of Pests and Plant Disease 1970-1980." (H. D. Burges, ed.), pp. 621-634. Academic Press, New York.

de Barjac, H., and E. Frachon. 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga* 35 : 233-240.

Dulmage, H. T., 1975. The standardization of formulations of the δ -endotoxins produced by *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 25 : 279-281.

Höfte, H., and H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53 : 242-255.

Holmes, K. C., and R. E. Monro. 1965. Studies on the structure of parasporal inclusions from *Bacillus thuringiensis*. *J. Mol. Biol.* 14 : 572-581.

Inagaki, S., M. Miyasono, T. Ishiguro, R. Takeda, and Y. Hayashi. 1992. Proteolytic processing of δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 in insensitive insect, *Spodoptera litura*: unusual proteolysis in the presence of sodium dodecyl sulfate. *J. Invertebr. Pathol.* 60 : 64-68.

Johnson, C., and A. H. Bisop. 1996. A technique for the effective enrichment and isolation of *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 142 : 173-177

Kalman, S., K. L. Kiehne, N. Cooper, M. S. Reynoso, and T. Yamamoto. 1995. Enhanced production of insecticidal proteins in *Bacillus thuringiensis* strains

carrying on additional crystal protein gene in their chromosome. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 : 3063- 3068.

Kim, H. S., H. W. Park, D. W. Lee, Y. M. Yu, J. I. Kim, and S. K. Kang. 1995a. Distribution and Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of sericultural farms in Korea. *Korean J. Seric. Sci.* 37(1) : 57- 61.

Kim, H. S., H. W. Park, S. H. Kim, Y. M. Yu, S. J. Seo, and S. K. Kang. 1993. Dual specificity of δ -endotoxins produced by newly isolated *Bacillus thuringiensis* NT0423. *Korean J. Appl. Entomol.* 32 : 426- 432.

Kim, L., 1993. *Advanced Engineered Pesticides*. Marcel Dekker, INC.

Kronstad, J. W., H. E. Schnepf, and H. R. Whiteley. 1983. Diversity of locations for *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. *J. Bacteriol.* 154 : 419- 428

Lacey, L. A., 1997. *Manual of Techniques in Insect Pathology*. pp. 64. Academic Press, INC.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (London) 227 : 680- 685.

Lecadet, M. -M., and D. Lereclus. 1984. Structure and toxicity of the *B. thuringiensis* δ -endotoxin recent development in genetics. *In* "Bacterial Protein Toxins." (J. E. Alouf, F. J. Fehrenbach, J. H. Freer, and J. Jeljaszewicz, eds.), pp.

147- 154. Academic Press, London.

Lüthy, P., J. L. Cordier, and H. M. Fischer. 1982. *Bacillus thuringiensis* as a bacterial insecticide: basic consideration and application. In "Microbial and viral pesticide." ed. Kurstak, E. pp. 35- 74. New York Marcel Dekker, INC.

Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Molecular Clonings: A Laboratory manuals Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

Martin, P. A. W., and R. S, Travers. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 : 2437- 2442.

Masson L., W. J. Moar, K. V. Frankenhuyzen and M. Bossé and R. Brousseau. Insecticidal properties of a crystal gene product isolated from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kenyae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(2) : 642- 646

Mignone C. F et al. 1996. Analysis of glucose carbon fluxes in continuous cultures of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46 : 78- 84.

Moar, W. J., L. Masson, R. Brousseau, and J. T. Trumbles (1990) Toxicity to *Spodoptera exigua* and *Trichoplusia ni* of individual p1 protoxins and sporulated cultures of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and NRD-12. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2480- 2483

Ohba, M., and K. Aizawa. 1978. Serological identification of *Bacillus thuringiensis*

and related bacteria isolated in Japan. *J. Invertebr. Pathol.* 32 : 303-309.

Padua. L. E., M. Ohba, and K. Aizawa. 1984. Isolation of a *Bacillus thuringiensis* strain (serotype 8a, 8b) highly and selectively toxic against mosquito larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 44 : 12-17.

Park, H. W., H. S. Kim, D. W. Lee, Y. M. Yu, B. R. Jin, and S. K. Kang. 1995. Expression and synergistic effect of three types of crystal protein genes in *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 214 : 602-607.

Roh, J. Y., H. W. Park, B. R. Jin, H. S. Kim, Y. M. Yu and S. K. Kang. 1996. Characterization of novel non-toxic *Bacillus thuringiensis* isolates from Korea. *Lett. Appl. Microbiol.* 23 : 249-252

Sanchis, V., D. Lereclus, G. Menou, J. Chaufaux, and M. -M. Lecadet. 1989. Multiplicity of delta-endotoxin genes with different insecticidal specificities in *Bacillus thuringiensis aizawai* 7.29. *Mol. Microbiol.* 2 : 393-404.

Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad., U.S.A.* 74 : 5463-5467

Southern, E. M., 1975. Detection of specific sequence among DNA fragment separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98 : 503-517

Visser B., E. Munsterman, A. Stocker and W. G. Dirkse. 1990. A novel *Bacillus*

thuringiensis gene encoding a *Spodoptera exigua*-specific crystal protein. *J. Bacteriol.* 172(12) : 6781- 6788

Whiteley, H. R., and H. E. schnepf. 1986. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Microbiol.* 40 : 549- 576.

Yamamoto, T., and R. E. McLaughlin. 1981. Isolation of a proteins from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* toxic to the mosquito larva, *Aedes taeniorhynchus*. *Biochems. Biophys. Res. Commun.* 103 : 414- 421.

3

1

가

가

(Integrated Pest Management: IPM)

가

(polyhedrin)

baculovirus

(Nucleopolyhedrovirus: NPV)가 가

가

NPV

Baculovirus Expression Vector

System (BEVS)

(Luckow Summers, 1988; Russ , 1992; Tomalski Miller, 1992), NPV

가

(Kelly, 1985). , NPV

가

가

NPV

가

가

(Bell , 1981).

가 가 (, 1990; , 1991)
3
가 (, 1995),
Bacillus thuringiensis (Bt)
(MacIntosh , 1990) 가
(Smits Vlak, 1988).

NPV

2

1.

1)

(*Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus: SeNPV)

(, 1991),

2.

1) Baculovirus

가 (*Spodoptera exigua*)

2) Baculovirus

Baculovirus 가

, baculovirus Bt

baculovirus . Bt

crystal baculovirus mode of action

Bt N- C-

subunit

alkali pH

, active form ,

가

1 2 .

, Btrus

Bt cry A(c) N-

Autographa californica

가

Bturs

Btrus

3

5

3)

가

4)

가

가

가

White carbon,

Triton

X-100,

Bentonite,

polyvinylalcohol

Sucrose

5)

가

가

가

6)

3

가

7)

8)

9)

potentiator

10)

11)

12)

가

13)

< >

3

1) Baculovirus

, 가 , ,
가

LD50 , LD50 3 1.64 × 104 /M \emptyset , 4

3 2.5 4.28 × 104 /M \emptyset (1). 5

3 390 6.40 × 106 /M \emptyset

(1). (1991) SeNPV ,

3 5 .

LD50 3 5 가 Smits Vlak (1988)

Larval instar	Dosage (PIB/ml)	LD50 (PIB/ml)		Slope(B)	Intercept	2	df
		LD50	LD50				
3rd	1.0×10^4	1.64×10^4	1.08×10^8	0.717	1.978	13.613	3
4th	1.0×10^4	4.28×10^4	1.08×10^8	0.732	1.610	2.709	4
5th	1.0×10^4	6.40×10^6	1.08×10^8	0.661	0.499	3.392	3
5th a)	1.0×10^4	1.02×10^5	1.08×10^8	0.366	3.168	13.918	4

Table 1. Median lethal dose(LD50) value of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus tested against 3rd, 4th and 5th instar *S. exigua* larvae

Larval instar	Dosage (PIB/ml)	LD50 (PIB/ml)	Slope(B)	Intercept	2	df
3rd	1.0×10^4	1.64×10^4	0.717	1.978	13.613	3
4th	1.0×10^4	4.28×10^4	0.732	1.610	2.709	4
5th	1.0×10^4	6.40×10^6	0.661	0.499	3.392	3
5th a)	1.0×10^4	1.02×10^5	0.366	3.168	13.918	4

a) *S. exigua* larvae were reared at 20 after inoculation.

Table 2. Median lethal time(LT₅₀) value of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus tested against 3rd, 4th and 5th instar *S. exigua* larvae

Larval instar	Inoculum (PIB/ml)	LT ₅₀ (day)	Slope(B)	Intercept	2	df
3rd	1.0 × 10 ⁴	14.92	2.265	2.342	0.352	5
	1.0 × 10 ⁵	9.68	2.964	2.078	0.908	5
	1.0 × 10 ⁶	6.46	8.110	-1.570	10.704	4
	1.0 × 10 ⁷	5.46	8.010	-0.906	4.170	5
	1.0 × 10 ⁸	5.39	10.367	-2.584	5.201	3
4th	1.0 × 10 ⁴	13.28	3.741	0.798	1.655	5
	1.0 × 10 ⁵	9.12	3.725	1.423	0.613	6
	1.0 × 10 ⁶	5.79	3.602	2.254	1.967	6
	1.0 × 10 ⁷	4.51	5.368	1.486	9.842	5
	1.0 × 10 ⁸	4.18	8.534	-0.302	3.535	4
5th	1.0 × 10 ⁶	9.69	7.167	-2.068	0.462	1
	1.0 × 10 ⁷	7.18	9.142	-2.825	1.248	2
	1.0 × 10 ⁸	6.40	6.582	-0.308	1.457	4
5th a)	1.0 × 10 ⁴	14.53	3.175	1.310	0.334	5
	1.0 × 10 ⁵	10.87	6.214	-1.440	0.120	5
	1.0 × 10 ⁶	9.75	6.963	-1.885	1.794	5
	1.0 × 10 ⁷	8.85	7.409	-2.016	7.725	7
	1.0 × 10 ⁸	7.58	9.642	-3.479	11.349	6

a) *S. exigua* larvae were reared at 20 after inoculation.

Table 3. Pathogenicity of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus against *S. exigua* larvae

Instar	Inoculum (PIBs/ml)	Mortality (%)
3rd	1.0×10^4	38.6
	1.0×10^5	61.1
	1.0×10^6	93.5
	1.0×10^7	100
	1.0×10^8	100
4th	1.0×10^4	33.3
	1.0×10^5	59.3
	1.0×10^6	86.7
	1.0×10^7	93.5
	1.0×10^8	100
5th	1.0×10^4	5.0
	1.0×10^5	10.0
	1.0×10^6	25.0
	1.0×10^7	60.0
	1.0×10^8	77.8
5th ^a)	1.0×10^4	38.9
	1.0×10^5	57.9
	1.0×10^6	69.0
	1.0×10^7	85.2
	1.0×10^8	100

a) *S. exigua* larvae were reared at 20 °C after inoculation.

2) Baculovirus

Baculovirus 가 가 , baculovirus

Bt baculovirus Btrus

. SDS- PAGE 92 kDa

33 kDa

, 59 kDa

.

. baculovirus가

Bt 가 N-

,

.

, 가

random deletion mutation

Btrus .

Bt cry A(c) N- *Autographa californica*

(AcNPV) 가

Btrus Btrus 24

DNA . SDS- PAGE

Western blot Btrus 가

92 kDa Btrus 33 kDa , Btrus

.

Btrus

Btrus .

3 5 ,

36.4% , refusal diet

Btrus .

3)

가

(Kurstak, 1982).

(4).

가 20

32.2 ± 3.2 , 25

17.3 ± 2.0 , 30

$10.5 \pm$

1.0 (, 1995).

가 가 5

25

20 5

가 가

, 4

20

5

2

, 3 93.5%

1.0×10^6 /M \emptyset

8.47×10^{11} 가

4 86.7%

1.0×10^6 /M \emptyset

13.36×10^{11}

가

20

5

1.0 × 10 ⁷	/M ²	85.2%	13.75 × 10 ¹¹
가	.	4	1.0 × 10 ⁶ /M ²
		가	.

Table 4. Yields of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus in relation to inocula and mortality in *Spodoptera exigua* larvae

Larval instar	Inoculum (PIB/ml)	Mortality (%)	PIB/dead larva (× 10 ¹⁰)	Total Yields ^{a)} (× 10 ¹¹)
3rd	1.0 × 10 ⁴	38.6	2.03	4.71
	1.0 × 10 ⁵	61.1	1.55	5.68
	1.0 × 10 ⁶	93.5	1.51	8.47
	1.0 × 10 ⁷	100	1.37	8.22
	1.0 × 10 ⁸	100	1.13	6.78
4th	1.0 × 10 ⁴	33.3	3.15	6.30
	1.0 × 10 ⁵	59.3	2.89	10.28
	1.0 × 10 ⁶	86.7	2.57	13.36
	1.0 × 10 ⁷	93.5	1.91	10.72
	1.0 × 10 ⁸	100	1.22	7.32
5th ^{b)}	1.0 × 10 ⁴	38.9	3.75	8.75
	1.0 × 10 ⁵	57.9	3.48	12.09
	1.0 × 10 ⁶	69.0	3.14	12.99
	1.0 × 10 ⁷	85.2	2.69	13.75
	1.0 × 10 ⁸	100	2.06	12.36

a) Total yields were calculated by total tested larvae, mortality and PIB per dead larva.

b) *S. exigua* larvae were reared at 20 after inoculation.

100 4 1.0×10^6
/Mℓ 8, 9, 10
, 8 2.21×10^{12} 2.09×10^{12} $2.21 \times$
10¹² 9 10

cannibalism

가

- 20

4) 가

가

가

carbon 1% 가 , White
1% 가 가 , sucrose
24

polyvinylalcohol 가

, 가 polyvinylalcohol

0.5% . Triton X-100 가 100%

가 95% Triton X-100

, 가 0.1%

5)

2×10^8

30Mℓ

100g sucrose,

(6). 3

Table 6. Pathogenicity of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus technical powder and formulation.

Infection dose (PIB/Larvae)	Mortality (%)	
	SeNPV technical powder	SeNPV formulation
1×10^3	20.5	28.6
1×10^4	38.6	40.0
1×10^5	68.2	71.0
1×10^6	92.0	93.9
1×10^7	100.0	100.0

7)

2×10^7

20 , 30 , 40 , 50

1, 3, 100%, (7).
 가
 가
 2
 × 10⁷ /ml 1, 2, 3
 3, 30%, 70%
 가
 (1).

Table 7. Effect of formulation on the protection of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus from heat inactivation.

Treated temperature	Mortality (%)	
	SeNPV technical powder	SeNPV formulation
20	100	100
30	100	100
40	100	100
50	100	100

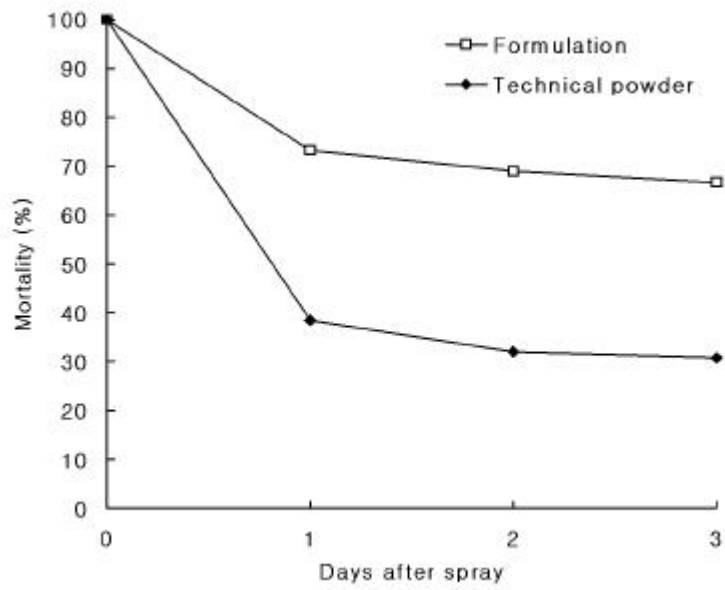


Fig. 1. Effect of Formulation on the protection of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus from sunlight

, polyvinylalcohol 가

260nm

, polyvinylalcohol 가

8)

2×10^6

/Ml, 1×10^7

/Ml, 2×10^7

/Ml

2×10^6 /mL, 67.4%, 1×10^7 /mL
 85.7%, 2×10^7 /mL, 87.5%
 41.7%, 58.5%, 60.0%
 가 가 , 1×10^7
 /mL 가 (2).

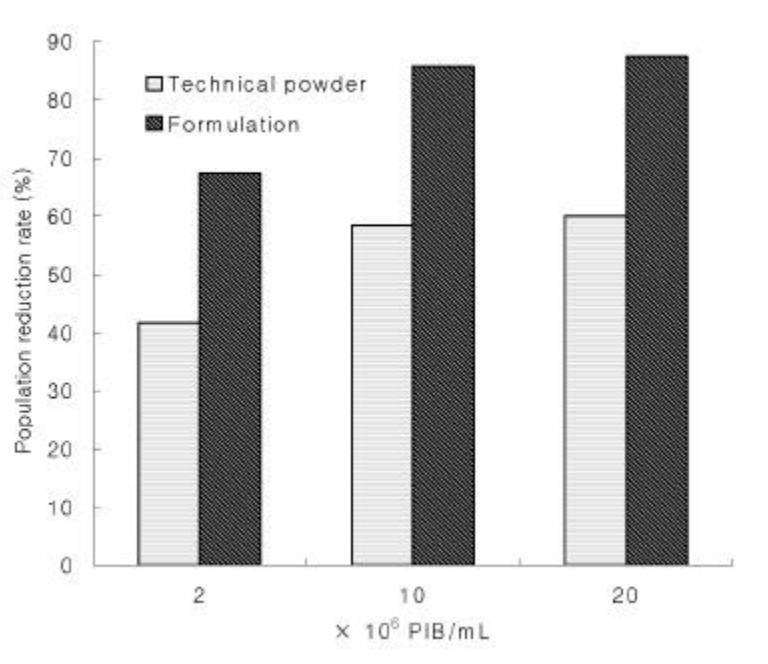


Fig. 2. Pathogenicity of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus technical powder and formulation in field assay

9)

, 1×10^7 /mL

100% 가 . 85.7% 가

potentiator tinopal Bacillus

thuringiensis (Bt) NT0423 . potentiator

0.1% Tinopal, 0.01% Bt, 0.05% Bt 가

0.05% Bt 가

10 100% potentiator 0.05%

Bt 가

(3).

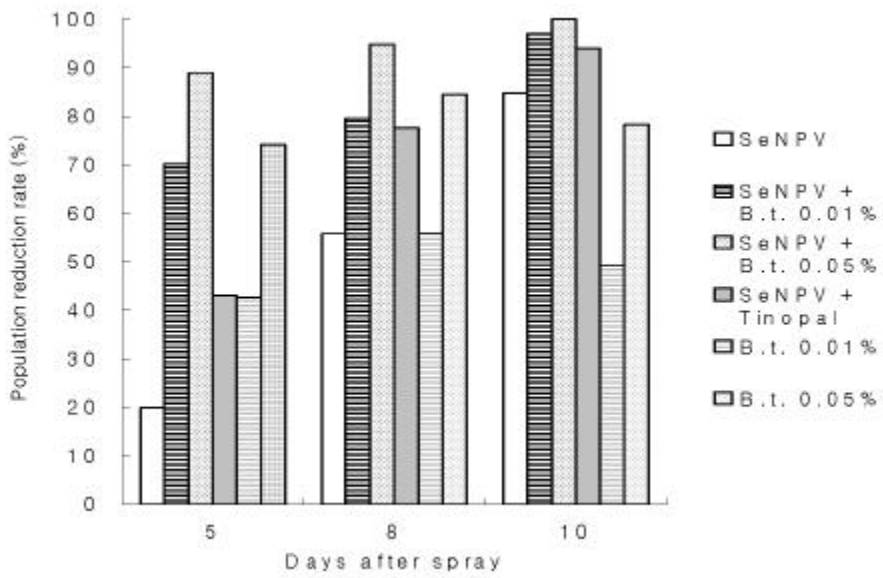


Fig. 3. Increasing effect in pathogenicity of formulation by addition of potentiator

10)

가 가

, 4 1 × 10⁶ 8
 2.21 × 10¹⁰ 가 .
 가 가 ,
 White carbon 1%, sucrose 1%,
 polyvinylalcohol 0.5%, Triton X-100 0.1% 가 가

11)

가

10
 1 × 10¹⁰ 150ml
 White carbon 100g, sucrose 100g, polyvinylalcohol 50g,
 Triton X-100 10ml, Bentonite 10g, potentiator Bt
 NT0423 5g 가 (8), V (4).

Table 8. Composition of viral insecticide

V

Ingredient	Formulation	Ingredient / last volume (%)
White carbon	100g	1
Sucrose	100g	1
Polyvinylalcohol	50g	0.5
Triton X- 100	10Mℓ	0.1
Bentonite	10g	0.1
Bt NT0423	5g	0.05
Virus (1×10^{11} PIB)	150Mℓ	1×10^7 PIB/Mℓ

Add the ingredients of the formulation to 10 of water for field use.



Fig. 4. The viral insecticide V

12)

13)

V

가 가

가

LD50 LT50 , LD50
 3 1.64 × 104 /Mℓ , 4 3 2.5 4.28
 × 104 /Mℓ , 5 3 390 6.40 × 106
 /Mℓ . LT50 가
 , , 5
 25 20 25
 1 . ,
 , 4 1.0
 × 106 /Mℓ 가 ,
 8 2.21 × 1012
 Baculovirus 가 가 , baculovirus
 Bt baculovirus Btrus 3
 36.4% , 5 refusal diet
 가 ,
 White carbon 1% , sucrose 1% ,
 polyvinylalcohol 0.5% , Triton X- 100 0.1% .

, polyvinylalcohol 가

2×10^6 /Mℓ 67.4%, 1×10^7 /Mℓ
85.7%, 2×10^7 /Mℓ 87.5% 41.7%,
58.5%, 60.0% 가

1×10^7 /Mℓ 가

potentiator 가 , 0.05%

Bt 가 10 100%

V

V

가 가

가 가

5

가

, , Bt

, 가

가 1×10^7 /ml 가 ,
potentiator 0.05% Bt NT0423 가 100% .

가

6

, , , (1990) 1988 ().
28 : 246 263.

Bell, R. A., C. D. Owens, M. Shapiro and J. R. Tardif (1981) Mass rearing and virus production. In; Doane, C. C. and M. L. McManus (ed). The Gypsy moth : Research toward integrated pests management. USDA Tech. Bull. 1584 : 599 655.

, , (1991)

, , , (1991)
30(2) : 144 149.

Kelly, D. C. (1985) The structure and physical characteristics of baculoviruses. In; Shermann, K. E. and K. Maramorosch (ed). *Viral Insecticides for Biological Control*. Academic Press, New York. pp. 469 488.

, , , , (1991)
30 : 111 116.

Kurstak, E. (1982) In [Microbial and Viral pesticides] pp. 335 507. Dekker. New York.

Luckow, V. A. and M. D. Summers (1988) Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Bio/Technology* 6 : 47 55.

MacIntosh, S. C., T. B. Stone, S. R. Sims, P. L. Hunst, J. T. Greenplate, P. G. Marrone, F. J. Periak, D. A. Fischhoff and R. L. Fuchs (1990) Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. *J. Invertebr. Pathol.* 56 : 258 266.

(1995) . 5-6 : 17 21.

Russ E., D. R. O'Reilly, B. D. Hammock and L. K. Miller (1992) Insecticidal properties of genetically engineered baculoviruses expressing an insect juvenile hormone esterase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 : 1583 1591

Smits, P. H. and J. M. Vlak (1988) Biological activity of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus against *S. exigua* larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 51 : 107 114.

Tomalski, M. D. and L. K. Miller (1992) Expression of a paralytic neurotoxin gene to improve insect baculoviruses as biopesticides. *Bio/Technology* 10 : 545 549.

2

4

:

4

1

I.

가

가

2

連用

가

가

低毒性

1938

DDT가

BHC, aldrin, endrin

가

가

1945

9

DDT

Nabam

90%,

20%,

61%,

42%

가

9

4-6%,

3-6%

가

(鈴田 宮本, 1980).

DDT

가

가

“樂觀

(the era of optimism)”

(Metcalf, 1980).

1958

가

(resistance), (resurgence), (residue),

(湯嶋, 1973; Brown, 1978; 田中金澤, 1979).

, Wigglesworth(1945) "DDT 劍" DDT

가 .

Carson(1962) "Silent Spring" "

가?

"

, 가

가 .

DDT, parathion

1960

가

"懷疑 (the era of doubt)"

(Metcalf, 1980).

危害性,

, ,
 , (Miyakado, 1986; Arnason , 1989).
 (lead compound) ,
 ,
 ,
 ,
 (Physostigma venenosum)
 physostigmine(eserine)
 (Metcalf March, 1950), physostigmine N - methyl
 carbamoyl carbaryl 가
 (Kuhr Dorough, 1976), pyrethrin
 가 가 (Elliot, 1976).
 Lumbriconereis heteropoda
 Marenz 가 ,
 nereistoxin ,
 cartap (Sakai, 1966).
 , ,
 ,
 가 가
 , know-how
 가 , 趙 (1987), 安 趙(1992), 安 (1992)

150 , 50

20

II.

1.

150

Cassia tora 49

19

2

“

”

1990

- 1995

(

1994 33: 225- 229;

1995 34: 200- 205;

1996 35: 153- 158,

1994 37: 492- 497, 503- 508; J. Chem. Ecol. 1995 21: 263- 271).

가

, (溫陽民俗博物館

學藝研究室 編, 1302年阿彌陀佛腹藏物 調查研究, 1991; 科學百科事典出版社 編, 藥草

成分 利用, , 1991), (潘吉星, 中國造紙技術史稿, 北京文物出版社,

1979; 錢存訓著·宇都木章 外譯, 中國古代書籍史, 法政大學出版局, 1986; 森八郎, 藥香の

防蟲效果, 保存科學 14, 1975; 上海科學技術出版社·小學館 編, 中藥大辭典 2, 小學館,

1985), (寺島良安著·島田勇雄 外譯, 和漢三才 會 7, 東洋文庫, 平凡社, 1987; 古事

類苑 48, 吉川弘文館, 1970; 渡 武, 正倉院寶庫の藥物, 書陵部紀要 7, 1956; 朝比奈泰彦

編, 正倉院藥物, 植物文獻刊行會, 1955)

23

(

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

)

,

25

(

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,).

50 g

500 mL Erlenmeyer flask

300 mL

. 2

40

2.

10

가 가

가

312

가

가

UR WTO

가

가

(Ahn , 1992).

3.

7

趙 (1987), 安 · 趙(1992), 安 (1992)

가

(, 1987),

4,000- 8000 ppm

Ahn

(1992)

. 1

1)

(: 秋晴) (5 cm) 3 5 (topical application method) , (spray method) 7
 (φ 3 × 15 cm) 가
 3 20 ,
 8,000 ppm , 48

0.01 mg/0.2 ml
 , (5 cm) 10
 (φ 3 × 15 cm)
 가 20 가 20
 , (BURKARD, UK)
 가 0.2 ml , 24

2)

(:) cork borer (φ 5 cm) 1
 8,000 ppm 10 , hood
 (φ 9 cm) 3 4 10
 25 48

3)

(: NC81) cork borer (φ 5 cm) 1 8,000 ppm
 10 hood (φ 9 cm)

10

25

48

4)

cork borer

(ϕ 5 cm) 1

8,000 ppm

10

hood

20

48

5)

, 5 mg

1

ml

(3 cm)

3 (10)

diet cup

48

4.

1)

50 2

(關東理化器製作所, 日本)

6 kg 5,000 ml

3,000 ml

3

(EYELA autojack NAJ- 160, Japan)

2

2)

20 g 800 ml 800 ml 2 L
가 가
, 30 ,
800 ml 2 .
800 ml
, 30 ,
800 ml 2 .
, 800 ml
2 .
, , 4
, (Vertis, USA)
, , (EYELA
autojack NAJ- 160, Japan) .

3)

10 g 30 ml 30 g silica gel(70 230
mesh, Merck) 가
column(ϕ 5.5 \times 70 cm, PTEE end plate) (70 230
mesh, Merck) 500 g ,
10 ml . / = 99/1,
97.5/2.5, 95/5, 90/10, 80/20 1,000 ml
, 10 ml, 50 ml .
(TLC: Thin layer chromatography) TLC plate(SIL G/UV254,
0.25 mm, MACHEREY -NAGEL, Germany) spot pattern UV hand
lamp(UVGL- 58, UV- 254/366 nm, UVP Inc., USA) , spot

인되면 서로 합쳐 감압농축한 후 상기의 방법에 따라 생물검정을 행하였다.

4) 고속액체크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography; HPLC)

크로마토그래피에 의해 분리된 각각의 활성획분은 먼저 UV spectrophotometer (HP 8452A Diode Array Spectrophotometer, Hewlett Packard)를 이용하여 최대 흡수 파장을 검색하였다(reference solvent; methanol). 분석용으로는 Tosoh HPLC system 을 사용하였으며, 조건은 표 1.1에 나타내었다. 분취용으로는 Waters HPLC system을 사용하였으며, 조건은 표 1.2에 나타낸 바와 같다.

각 활성획분은 분석용 HPLC chromatogram상에서 순수한 단일 peak가 생길 때 까지 생물검정을 병행하면서 연속적으로 HPLC를 수행하였다.

표 1.1. 분석용 HPLC 조건

HPLC system	Tosoh CCPM-8010 HPLC system with two solvent delivery pumps, Tosoh SC-8010 controller and Tosoh UV-8010 detector
Column	Partisil ODS column(4.6mm i.d.×15 cm, particle size 10 μ m)
Guard column	Philips TSK-Gel ODS column(3.2 mm I.D.×1.5 cm)
Detection range	0.001 ABU/FS
Solvents used	Methanol, Water, Acetic acid(for HPLC)
Flow rate	1 ml/min
Sample injected	0.1 ml with Hamilton 1.0 ml syringe

표 1.2. 분취용 HPLC 조건

HPLC	Waters Delta Prep 4000 HPLC system with two solvent delivery pumps, Waters Prep 4000 controller, Rheodyne 7010 injector, Waters 746 data module and Waters 486
Column	Tunable (UV/VIS) Absorbance Detector Bondapak C18 column(19 mm I.D.×30 cm, particle size 125Å), Waters
Detection range	1.0 ABU/FS
Solvents used	Methanol, Water(for HPLC)
Flow rate	10 ml/min
Sample injected	1.0 ml with Hamilton 1.0 ml syringe

5. 살충성분의 화학구조 결정

최종정제된 은행나무잎, 울금 및 정향의 살충성분은 GC-MS(JEOL JMS-DX 303), High Resolution(HR)-MS(JEOL JMS-DX 303), ¹H(500MHz) 및 ¹³C(100MHz) NMR(Jeol GSX- 400, TMS as an internal standard), High Resolution(HR) FT-IR(Digilab, BIORAD FT-80), UV(WATERS 490)등의 spectral analysis로 화학구조를 결정하였다.

6. 정제성분의 살충활성

분리, 정제된 살충성분의 벼멸구 암컷성충에 대한 살충력은 미량국소처리법으로 처리하였으며 각 농도당 60마리를 공시하였다. 담배겨세미나방 3령유충과 배추좀나방 3령유충은 엽침지법으로 처리하였으며 각 농도당 20마리를 공시하였다, 복숭아혹진딧물 성충은 침지법으로 처리하였으며 각 농도당 300마리를 공시하였다. 쌀바구미와 팔바구미 성충은 여지확산법으로 처리하였으며 각 농도당 20마리를 공시하였다. 점박이용애 성충은 분무법으로 검정하였으며 각 농도당 20마리를 공시하였다. 24시간 후에 사충수를 조사하여 Finney(1971)의 Probit 분석법에 따라 LD₅₀ 및 LC₅₀을 구하였다. 보정사충율은 Abbott(1925)의 방법에 따라 산출하였다.

7. 아세틸콜린에스테라제 저해활성 측정

AChE 저해 실험은 다음과 같다. 아세톤에 일정농도 단계별로 희석된 bilobalide 및 paraoxon을 30 μ l씩 15 ml 용량의 시약조제용 시험관에 넣고 아세톤이 휘발된 후 상기 완충용액 1.25 ml를 넣고 효소원(1,000g 여과액) 0.5 ml를 가한 후 항온수조 (Precision Co., USA)를 이용, 30°C에서 15분간 진탕배양하고 다시 0.01 M DTNB 0.1 ml(최종농도 3.8×10^{-4} M)와 0.075 M acetylthiocholine iodide 0.1 ml를 첨가한 후, 30°C에서 30분간 진탕하고 나서 즉시 5 mM eserine 0.1 ml를 가하여 반응을 정지시키고 자외/가시광 분광광도계를 이용하여 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소원을 넣지 않은 시험관을 대조로 이용하였고, 살충제를 넣지 않은 시험관의 흡광도를 AChE 활성으로 간주하였다.

AChE의 약제 감수성(I_{50} : AChE활성을 50% 저해하는 저해제 농도)은 살충제 농도별 AChE 저해율을 계산하여 probit 분석법에 의해 산출하였다. 효소원은 전 실험기간중 4°C이하로 유지하여 사용하였으며 모든 실험은 3반복으로 하였다.

8. 급성독성실험

실험동물로서 S1c : 삼육농장으로부터 구입한 ICR계통의 생쥐(4주 생의 암컷, 체중 24 g)를 이용, 실험에 들어가기 전에 1주간 실험실에서 순화시켰으며, 실험은 6주된 생쥐를 이용하였다. 고형사료 (삼육 동물제품: 조단백질 > 19.6%, 조섬유 < 7.0%, 조회분 < 9.0%, Ca < 0.6%, P < 0.4%, DCP > 16.5%, TND > 7.3%, 항생물질 < 50 ppm)로, 온도 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 60%, 명암(12:12)의 조건하에서 사육하였으며, 물은 필요에 따라 공급하였다.

Ginkgolide C와 bilobalide를 옥수수 기름에 녹인 후 주입기를 이용하여 농도별로 생쥐에 경구 투여하였다. 투여 48 시간 후에 사망율을 조사, probit 분석법에 의해 LD_{50} 값을 산출하였다.

9. 돌연변이원성 검정

1) 시험 균주

시험균주는 한국화학연구소 안전성연구센터의 *Salmonella typhimurium* TA-1535, TA-1537, TA-98 및 TA-100을 이용하였으며, 사용균주의 유전자형 확인을 위해 ①histidine 요구성 여부 ②uvrB mutation 유지 여부 ③R-factor 유지 여부 ④rfa mutation 유지 여부 ⑤spontaneous revertant의 수 등을 확인하는 시험을 Maron과 Ames(1983)의 방법에 따라 실시하였다.

유전형질이 확인된 균주들은 nutrient broth 에 접종, 배양하여 현탁액 1ml 당 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 90 μ l 가하여 냉동보관용 tube(Nunc)에 채워 dry-ice 에서 동결시킨 후 약 -80°C 에서 보관하였다. Nutrient broth는 oxid nutrient broth No.2 2.5g 을 100ml 증류수에 녹인 후 4개의 200ml 삼각플라스크에 분주하여 고압 증기멸균(121°C , 15 min)하였다. 냉동균주를 해동, 0.1 ml을 취해 25 ml의 nutrient broth에 접종하여 37°C , 120 rpm으로 진탕배양 하였으며 약 16시간 동안 배양 후 시험에 사용하였다.

2) 대사활성계(S-9 mix)의 조제

간균질액(S-9분획)은 수컷 Sprague-Dawley계 쥐(체중 240g 내외)로부터 Aroclor -1254를 효소유도제로 하여 Maron과 Ames(1983)의 방법에 따라 조제, 80°C 에 보관하여 사용하였다. S-9 mix는 상기 간균질액에 시판 cofactor를 혼합하여 사용직전에 조제, 얼음에 채워 사용하였으며 그 조성은 다음과 같다: $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 8 μmol ; KCl, 33 μmol ; glucose-6-phosphate, 5 μmol ; NADH, 4 μmol ; NADPH, 4 μmol ; Na_2HPO_4 , 100 μmol ; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 μmol ; S-9 homogenate, 0.4 ml; Distilled water 9.6 ml.

3) 시험방법

Bilobalide를 DMSO에 용해하여 5 mg/ml 액을 만들고 이를 단계희석하여 각 농도의 원액을 조제하였다. 음성대조물질로는 bilobalide의 희석에 사용한 DMSO를

사용하였으며, 양성대조물질 Sodium azide는 멸균증류수에, 2-Aminofluorene 및 9-Amino acridine는 DMSO에 용해하여 사용하였다.

예비시험에서는 TA-98 및 TA-100을 사용해 16, 80, 400, 2000, 10000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 의 농도 범위로 시험하였는데, 2,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 부터 치사효과가 나타났으며 그 이하의 농도에서도 콜로니수의 증가는 없었다. 따라서 본 시험에서는 최고농도를 500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 로 하고 공비를 2로 하여 31.2, 62.5, 125, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 의 5개 농도를 설정하여 시험하였다.

시험물질의 처리는 각 농도군당 3개의 플레이트를 사용, direct plate incorporation 방법으로 하였다. 고압증기 멸균한 Top agar를 45°C로 예열한 멸균 tube(Falcon #2054)에 2 ml씩 분주한 다음 시험물질용액 100 μl , S-9 mix 500 μl (대사 활성계 적용시), 균배양액 100 μl 를 Top agar에 혼합, 즉시 Vortex mixer로 2-3 초간 진탕하여 Minimal glucose agar plate에 부어 여러 방향으로 기울여 고루 퍼지게 하여 굳힌다. 음성대조군은 DMSO만 100 μl 가하여 같은 방법으로 실시하였으며, S-9 mix를 처리하지 않은 군에는 S-9 mix 대신 동량의 증류수를 처리하였다. Top agar가 굳으면 플레이트를 뒤집어 37°C에서 약 48시간 동안 배양한 후 콜로니수를 계수하였다.

Top agar는 agar 0.6 g과 NaCl agar 0.5 g을 100 ml 증류수에 녹인 후 고압증기 멸균(121°C, 15 min)한 후 0.5 mM histidine-biotin액 10 ml를 혼합하여 사용하였고, Minimal glucose agar plate는 15 g agar를 증류수 930 ml에 녹여 고압증기멸균(121°C, 15 min)한 후 별도로 고압증기멸균한 50x VB(Vogel과 Bonner, 1956) salt 20 ml와 40% glucose 액을 혼합한 다음 25 ml씩 plate에 분주하여 사용하였다.

4) 돌연변이원성의 판정

돌연변이원성의 여부는 3개 플레이트의 평균 콜로니수가 처리농도의 증가에 따라 3농도 이상에서 일관성있게 증가하면서 음성대조군에 비해 2배 이상일때 양성으로, 2배 미만인 경우에 음성으로 판정하였다.

III. 결과

1. 살충활성 스크리닝

1) 한방식물체(방향성)

한방식물 20종의 주요 유해생물 7종에 대한 살충활성을 표 1.3에 나타내었다. 벼멸구의 경우 공시 식물체중에서 은행나무잎에서 100%, 정향, 후추, 천궁, 울금에서 80% 이상의 사충율을 나타내었다.

십자화과 작물의 중요해충인 배추좀나방의 경우 후추, 천궁, 울금에서 80% 이상의 살충활성을 보였다.

점박이용애의 경우 마에서 80 이상의% 사충율을 나타내었다.

담배거세미나방과 복숭아혹진딧물에 대해서는 강한 살충활성을 나타내는 식물체는 없었다.

공시식물체들 중에서 목단피(모란의 뿌리 껍질), 정향 그리고 석창포가 쌀바구미에 대해 기피활성을 통한 살충활성을 나타내었다. 그러나, 공시식물체 모두 팔바구미에 대해서는 어떤 활성도 나타내지 않았다.

2) 국내산 식물체

국내산 식물 150종 식물체의 메탄올 조추출물의 주요 농업해충 5종에 대한 살충활성을 5000 ppm 농도로 처리하였을 때의 살충활성을 표 1.4에 나타내었다. 벼멸구의 경우 공시식물체중에서 초피나무 수피, 편백 잎, 비목나무 잎 추출물에서 95%이상의 사충율을 나타내었다. 배추좀나방의 경우 초피나무 수피 추출물에서 70%의 사충율을 보였으나, 기타 식물체의 경우에는 거의 활성을 나타내지 않았다. 담배거세미나방의 경우 모든 식물체의 경우에는 거의 활성을 나타내지 않았다. 점박이용애의 경우 보리밭나무 잎, 광대싸리 잎 + 줄기, 두릅나무 잎, 초피나무 수피, 참가시나무 잎과 모새나무 잎 추출물에서 80% 이상 살비효과를 보였다.

표 1.3. 방향성 한방식물체의 주요 7종 해충에 대한 살충활성^a

식물명	조직명 ^b	살충활성 ^c						
		BPH ^d	GPA	DBM	TCW	TSSM	RW	ABW
후박 <i>Magnolia officinalis</i>	Co	-	-	-	-	-	-	-
정향 <i>Eugenia aromatica</i>	Ra	+++	-	-	-	-	++	-
목단피 <i>Paeonia suffruticosa</i>	RC	+	-	-	-	-	++	-
후추 <i>Piper nigrum</i>	Fr	+++	-	+++	-	-	-	-
대황 <i>Theum coreanum</i>	Fr	-	-	-	-	-	-	-
영릉향 <i>Lysimachia foenum-gaecum</i>	He	-	-	-	-	++	-	-
산목 <i>Clematis finetiana</i>	Fr	-	-	-	+	-	-	-
단목 <i>Nauclea officinalis</i>	Ra	-	-	-	+	-	-	-
오수유 <i>Evodia rutaecarpa</i>	Fr	-	-	-	-	-	-	-
촉초 <i>Zanthoxylum piperitum</i>	Fr	+	-	-	-	-	-	-
산초 <i>Zanthoxylum piperitum</i>	WP	++	-	-	-	-	-	-
마 <i>Dioscorea batatas</i>	WP	-	-	-	-	+++	-	-
백부근 <i>Stemona japonica</i>	Ra	-	-	-	-	-	-	-
침향 <i>Aquillaria agallocha</i>	Li	-	-	-	-	-	-	-
백지 <i>Angelica dahurica</i>	Ra	+	-	-	-	-	-	-
천궁 <i>Ligusticum chuanxiong</i>	Ra	+++	-	+++	-	-	-	-
감송향 <i>Nardostachys chinensis</i>	Rh	-	-	-	-	-	-	-
계심 <i>Viola vaginata</i>	WP	-	-	-	-	-	-	-
울금 <i>Curcuma longa</i>	Rh	+++	-	+++	-	-	-	-
유향 <i>Boswellia carterii</i>	WP	-	-	-	-	-	-	-
은행 <i>Ginko biloba</i>	L	+++	-	-	-	-	-	-

^a5000ppm treatment.

^bCo, Cortex; Fr, Fructus; He, Herba; L, leaf; Li, Lignum; Ra, Radix; RC, Radicus Cortex; Rh, Rhizoma.

^c+++ : >80%, ++ : 80-61%, + : 41-60%, - : <40%.

^dBPH (벼멸구), *Nilaparvata lugens*; GPA (복숭아혹진딧물), *Mysus persicae*; DBM (배추좀나방), *Plutella xylostella*; TCW (담배거세미나방), *Spodoptera litura*; TSSM (점박이용애), *Tetranychus urticae*; RW (쌀바구미), *Sitophilus oryzae*; ABW (팥바구미), *Callosobruchus chinensis*.

표 1.4. 국내산 식물체의 살충활성

식물명	부위	살충활성 ^a					
		BPH ^o	GPA	DBM	TCW	TSSM	
소귀나무	<i>Myrica rubra</i>	잎	+	-	-	-	-
생달나무	<i>Cinnamomum inponicum</i>	수피	-	-	-	-	-
호랑가시나무	<i>Ilex cornuta</i>	수피	-	-	-	-	-
짜구사리		잎	+	-	-	-	-
자작나무	<i>Betula platyphylla</i> var. <i>japonica</i>	목부	-	-	-	-	-
청미래덩굴	<i>Smilax china</i>	잎	-	-	+	-	--
굴피나무	<i>Platycarya strobilacea</i>	목부	-	-	+++	-	-
머루	<i>Vitis coignetiae</i>	줄기	-	-	++	-	-
나도밤나무	<i>Meliosma myriantha</i>	수피	-	-	+++	-	-
합다리나무	<i>Meliosma oldhamii</i>	수피	-	-	+	-	-
		잎	-	-	+	-	-
회화나무	<i>Sophora japonica</i>	잎	-	-	+++	-	-
매죽나무	<i>Styrax japonica</i>	잎	-	-	++	-	-
		목부	-	-	+	-	-
참회나무	<i>Euonymus oxyphyllus</i>	수피	-	-	+	-	++
		잎	-	-	-	-	-
비목나무	<i>Lindera orythrocarpa</i>	수피	-	-	+	-	-
		목부	-	-	+	-	+
철쭉꽃	<i>Phododendron schlippenbachii</i>	잎	-	-	+	-	-
		목부	-	-	+	-	-
복분자딸기	<i>Rubus coreanus</i>	잎	-	-	+	-	-
담쟁이덩굴	<i>Parthenocissus tricuspidata</i>	잎	-	-	++	-	-
향나무	<i>Juniperus chinensis</i>	잎	-	-	+	-	-
대만풍나무	<i>Liquidambar formosana</i>	잎	-	-	-	-	-
계수나무	<i>Cercidiphyllum japonicum</i>	잎	-	-	-	-	-
노린재나무	<i>Symplocos chinensis</i> for. <i>pilosa</i>	잎	-	-	-	-	-
대추	<i>Zizyphus jujuba</i> var. <i>inermis</i>	잎	-	-	-	-	-
보리수나무	<i>Elaeagnus umbellata</i>	잎	-	-	-	-	-
		줄기	-	-	-	-	-
갈참나무	<i>Quercus aliena</i>	잎	-	-	-	-	-
참느릅나무	<i>Ulmus parvifolia</i>	잎	-	-	-	-	-
말채나무	<i>Cornus walteri</i>	목부	-	-	-	-	-
광대싸리	<i>Securinega suffruticosa</i>	줄기	-	-	-	-	-
소사나무	<i>Carpinus coreana</i>	잎	-	-	-	-	-
벽오동	<i>Firmiana simplex</i>	수피	-	-	-	-	-
홍가시	<i>Photinia glabra</i>	수피	-	-	-	-	-
		목부	-	-	-	-	-
측백나무	<i>Thuja orientalis</i>	수피	-	-	+	-	-
		잎	-	-	-	-	-

표 1.4. (계속)

식물명	부위	살충활성 ^a					
		BPH ^o	GPA	DBM	TCW	TSSM	
산초나무	<i>Zanthoxylum schinifolium</i>	잎	-	-	-	-	-
나도밤나무	<i>Meliosma myriantha</i>	목부	-	-	-	-	-
수양벚나무		수피	-	-	-	-	-
모감주나무	<i>Koilreuteria paniculata</i>	잎	-	-	-	-	-
참식나무	<i>Neolitsea sericea</i>	잎	-	-	-	-	-
홍가시나무	<i>Photinia glabra</i>	잎	-	-	-	-	-
센달나무	<i>Machilus japonica</i>	목부	-	-	-	-	-
생달나무	<i>cinnamomum japonicum</i>	목부	-	-	-	-	-
산벚나무	<i>Prunus sargentii</i>	목부	-	-	-	-	-
오동나무	<i>Paulownia coreana</i>	수피	-	-	-	-	-
계수나무	<i>Cercidiphyllum japonicum</i>	목부	-	-	-	-	-
보리밥나무	<i>Elaeagnus macrophylla</i>	잎	-	-	-	-	+++
팔손이	<i>Fatsia japonica</i>	잎	-	-	-	-	-
육계나무	<i>Cinnamomum loureirii</i>	수피	-	-	-	-	-
돌배나무	<i>Pyrus pyrifolia</i>	잎	-	-	-	-	-
신나무	<i>Acer ginnala</i>	수피	-	-	-	-	-
히어리	<i>Corylopsis careana</i>	잎	-	-	-	-	-
사스레피나무	<i>Eurya japonica</i>	잎	-	-	-	-	+
후박나무	<i>Machilus thunbergii</i>	잎	-	-	-	-	+
녹나무	<i>Cinnamomum camphora</i>	잎	-	-	-	-	-
중가시나무	<i>Quercus glauca</i>	수피	-	-	-	-	+
헛개나무	<i>Hovenia dulcis</i>	목부	-	-	-	-	+
참식나무	<i>Neolitses sericea</i>	목부	-	-	-	-	+
복자기	<i>Acer triflorum</i>	잎	-	-	-	-	-
광대싸리	<i>Securinega suffruticosa</i>	잎+줄기	-	-	-	-	++
참느릅나무	<i>Ulmus parvifolia</i>	수피	-	-	-	-	-
음나무	<i>Kalopanax pictus</i>	목부	-	-	-	-	+
줄사철나무	<i>Euonymus fortunei</i> var. <i>radicans</i>	잎	-	-	-	-	+
개머루	<i>Ampelopsis brevipedunculata</i> var. <i>heterophylla</i>	줄기	-	-	-	-	-
굴피나무	<i>Platycarya strovilacea</i>	수피	-	-	-	-	-
붉가시나무	<i>Quercus acuta</i>	목부	-	-	-	-	-
참가시나무	<i>Quercus salicina</i>	수피	-	-	-	-	-
구실잣밤나무	<i>Castanopsis cuspidata</i> var. <i>sieboldii</i>	잎	-	-	-	-	+
아왜나무	<i>Viburum awabuki</i>	수피	-	-	-	-	-
		잎	-	-	-	-	-
계수나무	<i>Cercidiphyllum japonicum</i>	수피	-	-	-	-	-
자귀나무	<i>Albizzia julibrissin</i>	목부	-	-	-	-	-

표 1.4. (계속)

식물명	부위	살충활성 ^a					
		BPH ^b	GPA	DBM	TCW	TSSM	
두릅나무	<i>Aralia elata</i>	잎	-	-	-	-	++
초피나무	<i>Zanthoxylum peperitum</i>	수피	+++	-	++	-	++
층층나무	<i>Cornus controversa</i>	수피	-	-	-	-	+
편백	<i>Chamaecyparis obtusa</i>	잎	+++	-	-	-	+
섬쑥부쟁이	<i>Aster glehni</i>		-	-	-	-	+
참가시나무	<i>Quercus salicina</i>	잎	-	-	-	-	++
모새나무	<i>Vaccinium bracteatum</i>	잎	-	-	-	-	++
조록나무	<i>Distylium racemosum</i>	목부	-	-	-	-	-
비목나무	<i>Lindera erythrocarpa</i>	잎	+++	-	-	-	-
붓순나무	<i>Illicium anisatum</i>	수피	-	-	-	-	-
두충	<i>Eucommia ulmoides</i>	목부	-	-	-	-	-
해송	<i>Pinus thunbergii</i>	잎	-	-	-	-	-
진달래	<i>Rhododendron mucronulatum</i>	꽃	-	-	-	-	-
		줄기	-	-	-	-	-
종가시나무	<i>Quercus glauca</i>	잎	-	-	-	-	-
참취	<i>Aster scaber</i>		-	-	-	-	-
잣나무	<i>Pinus koraiensis</i>	잎	-	-	-	-	-
		수피	-	-	-	-	-
구상나무	<i>Abies koreana</i>	수피	-	-	-	-	-
멀구슬나무	<i>Melia azedarach</i>	잎	-	-	-	-	-
붉가시나무	<i>Quercus glauca</i>	수피	-	-	-	-	-
전나무	<i>Abies holophylla</i>	잎	-	-	-	-	-
서어나무	<i>Carpinus laxiflora</i>	잎	-	-	-	-	-
센달나무	<i>Machilus japonica</i>	잎	-	-	-	-	-
감탕나무	<i>Ilex integra</i>	잎	-	-	-	-	-
삼나무	<i>Cryptomeria japonica</i>	잎	-	-	-	-	-
조구나무	<i>Sapium sebiferum</i>	잎	-	-	-	-	-
굴피나무	<i>Platycarya strobilacea</i>	잎	-	-	-	-	-
송악	<i>Hedera rhombea</i>	잎	-	-	-	-	-
굴거리나무	<i>Daphniphyllum macropodum</i>	수피	-	-	-	-	-
화살나무	<i>Euonymus alata</i>	잎	-	-	-	-	-
조록나무	<i>Distylium racemosum</i>	잎	-	-	-	-	-
음나무	<i>Kalopanax pictus</i>	수피	-	-	-	-	-
모새나무	<i>Vaccinium bracteatum</i>	목부	-	-	-	-	-
삼나무	<i>Cryptomeria japonica</i>	잎	-	-	-	-	-
조구나무	<i>Sapium sebiferum</i>	잎	-	-	-	-	-
굴피나무	<i>Platycarya strobilacea</i>	잎	-	-	-	-	-
구상나무	<i>Abies koreana</i>	잎	-	-	-	-	-
신나무	<i>Acer ginnala</i>	목부	-	-	-	-	-
구절목서		잎	-	-	-	-	-
먼나무	<i>Ilex rotunda</i>	목부	-	-	-	-	-

표 1.4. (계속)

식물명	부위	살충활성 ^a					
		BPH ^b	GPA	DBM	TCW	TSSM	
편백	<i>Chamaecyparis obtusa</i>	수피	-	-	-	-	-
구상나무	<i>Abies koreana</i>	목부	-	-	-	-	-
방크스소나무	<i>Pinus banksiana</i>	잎	-	-	-	-	-
개비자나무	<i>Cephalotaxus koreana</i>	잎	-	-	-	-	-
육박나무	<i>Lozoste lancifolia</i>	목부	-	-	-	-	-
미역줄나무	<i>Tripterygium regelii</i>		-	-	-	-	-
자귀나무	<i>Albizzia julibrissin</i>	수피	-	-	-	-	-
잣나무	<i>Pinus koraiensis</i>	목부	-	-	-	-	-
모과나무	<i>Chaenomeles sinensis</i>	수피	-	-	-	-	-
방크스소나무	<i>Pinus banksiana</i>	수피	-	-	-	-	-
산딸나무	<i>Cornus kousa</i>	수피	-	-	-	-	-
느릅나무	<i>Ulmus davidiana</i> var. <i>japonica</i>	수피	-	-	-	-	-
자작나무	<i>Betula platyphylla</i> var. <i>japonica</i>	잎	-	-	-	-	-
느티나무	<i>Zelkova serrata</i>	수피	-	-	-	-	-
적송	<i>Pinus densiflora</i>	목부	-	-	-	-	-
태산목	<i>Magnolia grandiflora</i>	잎	-	-	-	-	-
나도밤나무	<i>Meliosma myriantha</i>	잎	-	-	-	-	-
버즘나무	<i>Platanus orientalis</i>	잎	-	-	-	-	-
취	<i>Pueraria thumbergiana</i>	잎+줄기	-	-	-	-	-
송악	<i>Hedera rhombea</i>	줄기	-	-	-	-	-
벽오동	<i>Firmiana simplex</i>	잎	-	-	-	-	-
보리수나무	<i>Elaeagnus umbellata</i>	줄기	-	-	-	-	-
소사나무	<i>Carpinus coreana</i>	수피	-	-	-	-	-
전나무	<i>Abies holophylla</i>	수피	-	-	-	-	+
모감주나무	<i>Koelreuteria paniculata</i>	수피	-	-	-	-	-
갈참나무	<i>Quercus aliena</i>	수피	-	-	-	-	-
리기다소나무	<i>Pinus rigida</i>	수피	-	-	-	-	-
목련	<i>Magnolia kobus</i>	목부	-	-	-	-	+
감태나무	<i>Lindera glauca</i>	잎	-	-	-	-	-

^a5000ppm treatment.

^bBPH, *Nilaparvata lugens*; GPA, *Mysus persicae*; DBM, *Plutella xylostella*; TCW, *Spodoptera litura*; TSSM, *Tetranychus urticae*. RW, *Sitophilus oryzae*; ABW, *Callosobruchus chinensis*.

3) 제주도산 식물체

제주도산 식물체의 자원화를 위하여 26종 식물체의 메탄올 조추출물 5000ppm (또는 1-5mg/여지)의 살충활성을 조사한 결과(표 1.5), 버멸구의 경우 공시식물체중에서 검은재나무, 곰의말채, 굴피나무, 말채나무, 백목련, 비자나무에서 80-90%의 사충율을 나타내었다. 배추좀나방의 경우 개벗나무, 검은재나무, 고추나무, 곰의말채, 괴물나무, 굴피나무, 까치박달, 담팔수, 돈나무, 때죽나무, 말채나무, 먼나무, 비자나무등에서 70-80%의 사충율을 보였다. 담배거세미나방의 경우에는 공시식물체 모두가 거의 살충활성을 나타내지 않았다. 점박이용애의 경우에는 개벗나무, 검은재나무, 곰의말채, 괴물나무, 구실갯밤나무, 굴피나무, 다정큼나무, 담팔수, 돈나무, 때죽나무, 말채나무, 먼나무, 모람, 무환자나무, 백목련, 비자나무등에서 70-80%의 살비활성을 나타내었다.

4) 국내산 미곡류의 살충활성

국내산 22종 미곡의 메탄올 추출물에 대한 버멸구, 복숭아혹진딧물, 점박이용애에 대한 살충활성을 검정한 결과(표 1.6), 늘보리, 흑향미의 메탄올 추출물이 버멸구에 대하여 강한 살충활성을 나타내었다. 복숭아혹진딧물의 경우, 메밀 메탄올 조추출물이 5000, 2500ppm에서 강한 살충활성을 나타내었다. 조, 기장, 밀, 쇠보리, 수수, 참깨, 흑향미 및 현미찰쌀의 메탄올 조추출물들은 점박이용애에 대하여 5,000 및 2,500ppm 농도에서 강한 살충활성을 보였다.

5) 콩과식물

콩과식물은 휴면중에 있기 때문에 일반 식물체와는 다른 활성을 나타낼 것으로 기대되고 있는데, 본 연구진에 의하여 여러 가지 약리활성이 보고된 바 있어 (Lee와 Ahn, 1997; Lee 등, 1998) 이들의 살충 성분을 탐색하였다. 25종의 콩과 종자를 메탄올로 추출하고 농축하여 생물검정을 위한 시료를 조제하여 살충활성을 조사하였다(표 1.7). 콩과식물의 메탄올추출물 중 버멸구, 배추좀나방, 복숭아혹진딧물, 담배거세미나방 및 점박이용애에 대하여 살충활성을 나타내는 시료는 없었다.

6) 인도산 식물체

열대 식물체는 다양한 생리활성을 가지고 있다는 것이 알려져 있어(Jacobson, 1988), 인도산 식물체로부터 살충성분을 탐색하기위하여 *Cassia tora* 외 49종의 시료 조추출물의 5종의 공시충에 대한 살충활성을 표 1.8과 표 1.9에 나타내었다. 인도산 식물체 50종의 5종 공시충에 대한 살충활성은 *Annona squamosa* 종자, *Adhotoda vasica* 잎, *Nerium indicum* 줄기, *Pongamia pinnata* 종자 추출물이 버멸구, 배추좀나방, 복숭아혹진딧물에 대하여 90% 이상의 살충효과를 보였다.

표 1.5. 제주도산 식물체의 살충활성

식물명	살충활성 ^a					
	BPH ^b	GPA	DBM	TCW	TSSM	
개벚나무	<i>Pinus leveilleana</i>	-	-	++	-	++
검은재나무	<i>Symplocos priumifolia</i>	+++	-	++	-	++
고로쇠나무	<i>Acer mono</i>	-	-	-	-	-
고추나무	<i>Staphylea bumalda</i>	+	-	-	-	-
곰의말채	<i>Cornus walteri</i>	+++	-	++	-	++
괴불나무	<i>Lonicera maackii</i>	++	-	++	-	++
구실잣밤나무	<i>Castanopsis cuspidata</i>	-	-	-	-	++
굴피나무	<i>Platycarya strobilacea</i>	+++	-	++	-	++
까치박달	<i>Carpinus cordata</i>	-	-	++	-	-
꾸지뽕나무	<i>Cudrania tricuspidata</i>	-	-	-	-	-
다정큼나무	<i>Raphiolepis umbellata</i>	-	-	-	-	++
담팔수	<i>Elaeocarpus sylvestris</i>	-	-	++	-	++
돈나무	<i>Pittosporum tobira</i>	-	-	++	-	++
매죽나무	<i>Styrax japonica</i>	++	-	++	-	++
말채나무	<i>Cornus walteri</i>	+++	-	++	-	++
먼나무	<i>Hex rotunda</i>	-	-	++	-	++
모람	<i>Ficus nipponica</i>	-	-	-	-	++
무환자나무	<i>Sapindus mukorossi</i>	-	-	-	-	++
물푸레나무	<i>Firaxinus rhynchophylla</i>	-	-	-	-	-
백목련	<i>Magnolia denudata</i>	-	-	-	-	++
병개암나무	<i>Corylus hallaisanensis</i>	-	-	-	-	-
병솔꽃나무		+	-	-	-	-
비자나무	<i>Torreya nucifera</i>	+++	-	++	-	++
산딸나무	<i>cornus kousa</i>	-	-	-	-	-
산수국	<i>Hydrangea serrata</i>	-	-	-	-	-
산유자나무	<i>Xylosma congestum</i>	-	-	-	-	-

^a5000ppm treatment.

^bBPH, *Nilaparvata lugens*; GPA, *Mysus persicae*; DBM, *Plutella xylostella*; TCW, *Spodoptera litura*; TSSM, *Tetranychus urticae*. RW, *Sitophilus oryzae*; ABW, *Callosobruchus chinensis*.

표 1.6. 잡곡류 추출물의 살충활성^a

종 자	BPH		GPA		DBM		TCW		TSSM	
	5000 ^b	2500	5000	2500	5000	2500	5000	2500	5000	2500
조 <i>Setaria italica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	++++	+++
기장 <i>Panicum miliaceum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	++++	++++
개기장 <i>Panicum bisulcatum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+
율무 * <i>Coix lachryma-jobi</i> var. <i>mayuen</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
귀리 <i>Avena sativa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
밀 <i>Triticum aestivum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
호밀 <i>Secale cereale</i>	++	+	-	-	-	-	-	-	++	++
보리 <i>Hordeum vulgare</i> var. <i>hexastichon</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
개보리 <i>Elymus sibiricus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
쇠보리 <i>Ischaemum crassipes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
늘보리	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
수수 <i>Sorghum bicolor</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	++++	+++
옥수수 <i>Zea mays</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+
들깨 <i>Perilla frutescens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++
참깨 <i>Sesamum indicum</i>	-	-	-	-	-	-	++	-	+++	+
메밀 <i>Bioperyum</i> <i>esculentum</i>	-	-	++++	+++	-	-	-	-	-	-
쌀 <i>Oryzae sativa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
흑향미	+++	++	-	-	-	-	-	-	++++	++
현미쌀	++	++	-	-	+	+	-	-	+++	++
현미쌀	+	-	-	-	-	-	-	-	++	+
흑임자	++	-	-	-	-	-	-	-	++	-
오미자 <i>Schizandra</i> <i>chinensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^a +++++, >90%; +++, 80-90%; ++, 61-80%; +, 40-60%; and -, <40%.

^b Unit: ppm.

표 1.7. 콩 종실 추출물의 살충활성

	Scientific name	Yield (%)	Insecticidal activity ^a				
			BPH	GPA	DCM	TCW	TSSM
새콩	<i>Amphicarpaea edgeworthii</i>	10.7	-	+	+	+	+
땅콩	<i>Arachis hypogaea</i>	5.3	-	-	-	-	+
해녀콩	<i>Canavalia lineata</i>	12.0	-	-	-	-	-
결명자	<i>Cassia obtusifolia</i>	13.3	-	-	-	-	-
새돈부	<i>Dunbaria villosa</i>	5.6	+	+	+	+	-
서리태	<i>Glycine max</i> var. <i>solitae</i>	10.0	+	+	-	-	-
약콩	<i>Glycine max</i> var. <i>yagkong</i>	5.5	-	-	-	-	+
흑태	<i>Glycine max</i> var. <i>hooktae</i>	6.6	-	-	-	-	-
방콩	<i>Glycine max</i> var. <i>bangkong</i>	5.4	+	-	-	-	-
금두	<i>Glycine max</i> var. <i>geumdu</i>	4.8	-	-	-	-	-
청태	<i>Glycine max</i> var. <i>chungtae</i>	11.1	-	-	+	+	+
울타리콩	<i>Glycine max</i> var. <i>wooltalikong</i>	1.9	-	+	-	-	-
메주콩	<i>Glycine max</i> var. <i>mejukong</i>	7.1	-	+	-	-	-
돌콩	<i>Glycine soja</i>	10.7	-	-	-	-	-
갯완두	<i>Lathyrus japonica</i>	12.0	+	-	-	-	-
붉은강남콩	<i>Phaseolus multiflorus</i>	5.3	-	-	-	-	-
새팥	<i>Phaseolus nipponensis</i>	5.7	-	-	-	-	-
녹두	<i>Phaseolus radiatus</i> var. <i>geodu</i>	7.8	-	-	+	+	+
거두	<i>Phaseolus radiatus</i> var. <i>aurea</i>	5.2	-	+	-	-	-
완두	<i>Pisum sativum</i>	3.6	-	+	-	-	-
여우콩	<i>Rhynchosia volubilis</i>	5.3	-	-	-	+	-
새완두	<i>Vicia hirsuta</i>	11.8	+	+	-	-	+
얼치기완두	<i>Vicia tetrasperma</i>	12.3	+	+	-	-	-
적두	<i>Vigna angulasis</i>	4.8	-	-	-	-	-
동부	<i>Vigna sinensis</i>	6.2	+	-	-	-	-

^a +++ > 80%; ++, 61-80%; +, 40-60%; and -, <40%.

표 1.8. 인도산 식물체의 베타말구에 대한 활성

식물명	조직	수율 (%)	살충활성 ^a		
			0.5 μ g/♀	0.25 μ g/♀	0.125 μ g/♀
<i>Acacia ferruginea</i>	L	18	-	-	-
	St	17	-	-	-
<i>Prosopis chinensis</i>	L	21	-	-	-
	St	22	++	++	+
<i>Acalypha indica</i>	L	23	-	-	-
<i>Jatropha integerrima</i>	Wp	15	-	-	-
<i>Ricinus communis</i>	L	22	-	-	-
<i>Acanthospermum hispidum</i>	Wp	9	-	-	-
<i>Artemisia maritima</i>	Wp	11	-	-	-
<i>Achyranthes aspera</i>	Wp	15	-	-	-
	St	13	-	-	-
<i>Acorus calamus</i>	Wp	20	-	-	-
<i>Adhatoda vasica</i>	L	28	+	+	-
	St	27	-	-	-
<i>Aegle marmelos</i>	L	25	++	++	++
	St	24	++	++	+
	Fr	19	+++	+++	++
<i>Murraya koenigii</i>	L	25	-	-	-
	St	28	-	-	-
<i>Agave americana</i>	Wp	5	-	-	-
<i>Annona squamosa</i>	Se	13	+++	+++	+++
<i>Arachis hypogaea</i>	Wp	23	-	-	-
<i>Pongamia pinnata</i>	L	15	-	-	-
	St	11	-	-	-
	Se	20	+++	++	-
<i>Sesbania grandiflora</i>	L	22	-	-	-
	St	22	-	-	-
<i>Azadirachta indica</i>	L	26	++	++	+
	St	23	+	+	-
	Se	17	++	++	+
<i>Melia azedarach</i>	L	21	-	-	-
	St	17	-	-	-
	Se	24	-	-	-
<i>Swietenia mahagoni</i>	L	19	-	-	-
	Fr	21	-	-	-
<i>Bassia latifolia</i>	L	16	-	-	-
<i>Madhuca indica</i>	L	15	-	-	-
	St	15	-	-	-
	Se	23	-	-	-
	Fl	25	-	-	-
	SO	26	++	++	+
	OC	12	-	-	-
<i>Bignonia anguis-cati</i>	L	24	-	-	-
	St	20	-	-	-
<i>Bougainvillea spectabilis</i>	L	24	-	-	-
	St	24	-	-	-
<i>Calotropis gigantea</i>	L	23	-	-	-
<i>Cannabis sativa</i>	Wp	22	-	-	-

^a>80%, +++; 61 to 80%, ++; 40 to 60%, +; <40%, -.

표 1.9. 인도산 식물체의 배추좀나방과 복숭아혹진딧물에 대한 살충활성

식물명	조직	수율 (%)	살충활성 ^a	
			배추좀나방	복숭아혹진딧물
			1250ppm	1250ppm
<i>Acacia ferruginea</i>	L	18	-	-
	St	17	-	-
<i>Prosopis chinensis</i>	L	21	-	-
	St	22	-	+
<i>Acalypha indica</i>	L	23	-	-
<i>Jatropha integerrima</i>	Wp	15	+	-
<i>Ricinus communis</i>	L	22	+++	+
<i>Acanthospermum hispidum</i>	Wp	9	+++	-
<i>Artemisia maritima</i>	Wp	11	+	-
<i>Achyranthes aspera</i>	Wp	15	-	-
	St	13	+	-
<i>Acorus calamus</i>	Wp	20	-	-
<i>Adhatoda vasica</i>	L	28	-	++
	St	27	-	+
<i>Aegle marmelos</i>	L	25	+	+++
	St	24	-	-
<i>Murraya koenigii</i>	Fr	19	+	-
	L	25	-	-
<i>Agave americana</i>	St	28	-	-
	Wp	5	+	-
<i>Annona squamosa</i>	Se	13	+++	-
<i>Arachis hypogaea</i>	Wp	23	++	-
<i>Pongamia pinnata</i>	L	15	-	+
	St	11	+	++
	Se	20	+++	+++
<i>Sesbania grandiflora</i>	L	22	-	-
	St	22	-	-
<i>Azadirachta indica</i>	L	26	+	+
	St	23	-	-
	Se	17	-	-
<i>Melia azedarach</i>	L	21	-	-
	St	17	-	-
	Se	24	-	-
<i>Swietenia mahagoni</i>	L	19	-	-
	Fr	21	-	-
<i>Bassia latifolia</i>	L	16	-	-
<i>Madhuca indica</i>	L	15	+	-
	St	15	++	-
	Se	23	+	-
	Fl	25	-	-
	SO	26	+++	-
<i>Bignonia anguis-cati</i>	OC	12	+	-
	L	24	+	-
<i>Bougainvillea spectabilis</i>	St	20	-	-
	L	24	-	-
<i>Calotropis gigantea</i>	St	24	-	-
	L	23	-	-
<i>Cannabis sativa</i>	Wp	22	-	-

^a>80%, +++; 61 to 80%, ++; 40 to 60%, +; <40%, -.

2. 살충활성성분의 분리 동정 및 대량생산체계 확립

1) 울금의 살충활성성분

벼멸구, 배추좀나방, 복숭아혹진딧물, 담배거세미나방에 살충활성을 갖는 울금의 살충활성 성분을 각종 크로마토그래피법을 이용하여 분리·정제한 후(그림 1.1), MS, ¹H (400 MHz) 및 ¹³C (100 MHz) NMR, FT-IR 등의 spectral techniques를 이용, 구조를 확인한 결과 *ar*-turmerone으로 동정되었다(그림 1.2).

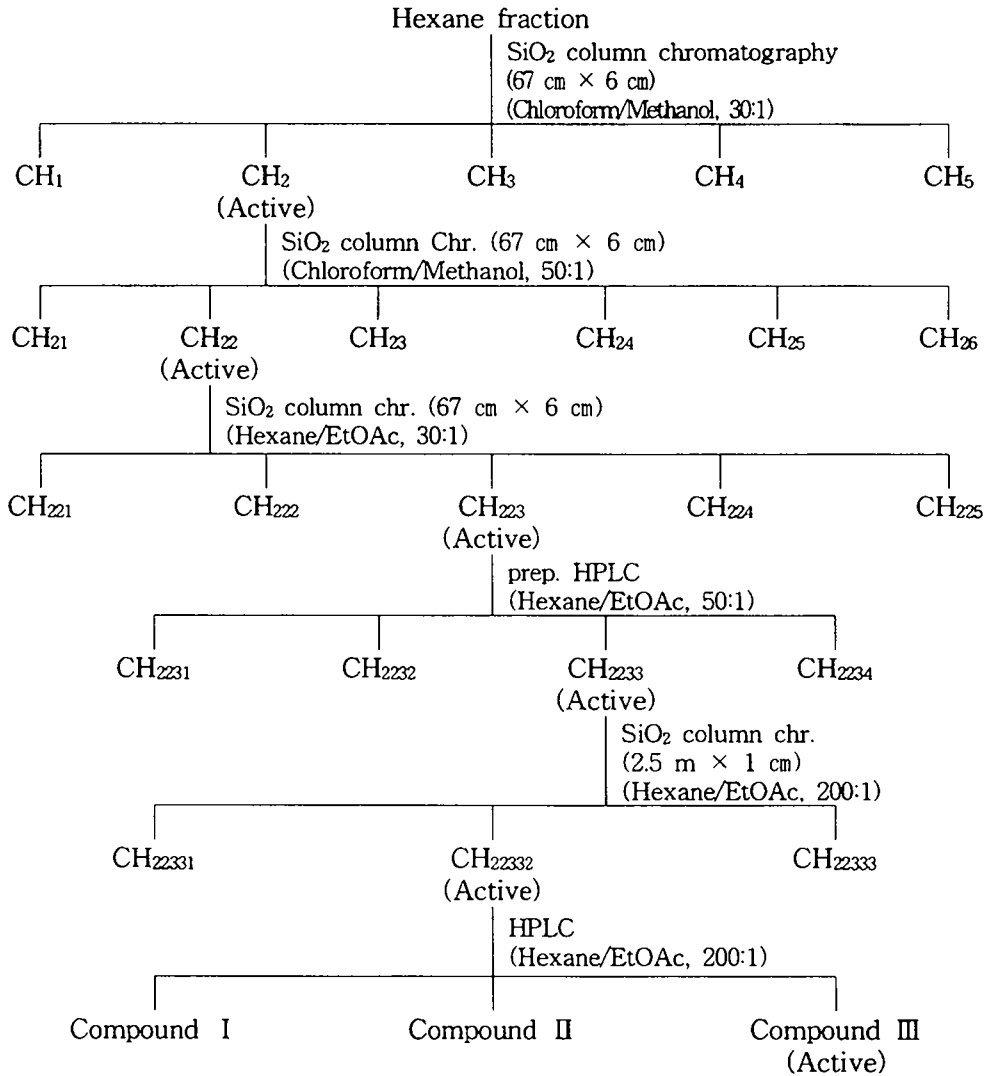


그림 1.1. 울금의 농약활성 성분의 분리.

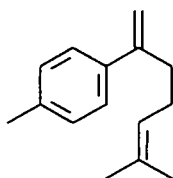


그림 1.2. *ar*-Turmerone의 구조.

표 1.10은 *ar*-turmerone의 살충활성을 나타낸 것으로 1000 및 2000 ppm 농도에서 벼멸구 및 배추좀나방에 대해 100% 살충활성을 보였고 500 ppm에서는 각각 60%와 81%의 살충활성을 보였다.

또한, 작물 생육중 식물병원균에 의한 피해는 5-50%정도로 알려져 있어, 병·해충 방제에 막대한 비용이 소요됨으로, 병·해충을 동시에 방제할 수 있는 농약의 개발이 시급한 실정에 있어 강한 살균활성을 갖는 울금을 이용하여 whole plant test를 이용하여 분리 정제한 결과(그림 1.1) *ar*-turmerone(그림 1.2)으로 동정되었으며 1000 ppm에서 토마토역병과 밀녹병에 대하여 100% 살균활성을 나타내었고, 500 ppm에서는 90%의 살균활성을 보여 새로운 용도로서의 울금의 응용이 기대되었다(표 1.11).

표 1.10. *ar*-Turmerone의 수중 해충에 대한 살충활성

Conc. (ppm)	살 충 활 성 (%)			
	BPH	DBM	GPA	TCW
2000	100	100	80	90
1000	100	100	50	30
500	65	81	10	0
250	40	52	0	0
100	20	24	0	0

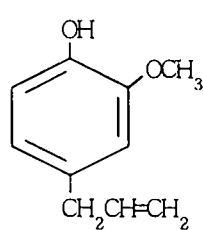
표 1.11. *ar*-Turmerone의 수종 식물병원균에 대한 살균활성

Conc. (ppm)	방 제 가 (%)			
	RSB ^a	CGB	TLB	BPM
2000	80	60	100	100
1000	45	20	100	100
500	30	5	90	92
250	20	0	58	78
100	15	0	30	55

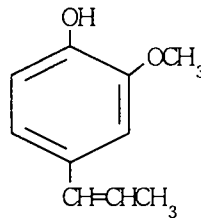
^aRCB, *Pyricularia grisea*; RSB, *Rhizoctonia solani*; CGB, *Botrytis cinerea*; TLB, *Phytophthora infestans*; WLR, *Puccinia recondita*; BPM, *Erysiphe graminis*.

2) 정향의 살충활성성분

십자화과 작물의 주요 해충인 배추좀나방과 주요 저장물해충인 쌀바구미에 대하여 강한 살충활성을 보인 정향을 헥산, 에틸아세테이트, 클로로포름, 물로 순차 분획하여 활성을 검정한 결과 헥산 획분에서 강한 살충활성을 보여 MS, ¹H (400 MHz) 및 ¹³C (100 MHz) NMR, FT-IR 등의 spectral techniques를 이용, 구조를 확인한 결과 eugenol 및 isoeugenol로 동정되었다 (그림 1.3).



Eugenol



Isoeugenol

그림 1.3. Eugenol과 Isoeugenol의 구조.

3) 은행잎의 살충활성성분 동정

MS, ^1H (400 MHz) 및 ^{13}C (100 MHz) NMR, FT-IR 등의 spectral analysis를 이용하여 구조를 동정하였다(그림 1.4; 1.5; 1.6; 1.7; 1.8; 1.9)

4) 은행잎의 살충활성성분의 대량생산체계 확립

은행 잎의 살충성분은 구조가 복잡하기 때문에 합성하기에는 경제적인 어려움이 있으며, 또한 제약회사의 혈액개선제 제조시 부산물에 다량 함유되어 있어 산업폐기물의 재활용이라는 관점에서 이들 부산물로부터 은행 잎 살충성분을 대량 생산할 수 있는 방법을 개발하였다(그림 1.10). 부산물 또는 은행 잎 추출물 300g을 물과 에틸아세테이트로 분배하여 에틸아세테이트 획분 12.5 g을 얻었으며, 이를 물/메탄올/아세트산 (70/30/1)의 용매에 녹인 후 여과시켜 활성을 띠는 노란색의 침전물을 얻었다. 그림 1.4의 각종 분리법에 따라 계속적으로 분리한 결과, 정제된 3종의 획분인 I (ginkgolide A) 200 mg, II (ginkgolide B) 150 mg 및 III (ginkgolide C) 200 mg을 얻었다(그림 1.11).

Bilobalide ; BP: $>250^\circ\text{C}$; IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1809, 1790, 1775; UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm(ϵ): 221(113); EI-MS (70 eV) m/z (% rel. int.): M^+ 326 (7), 270 (19), 224 (8), 196 (22), 129 (37), 15 (100); ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz): δ 1.21 (9H, s), 2.34 (1H, dd, $J = 13.6, 7.0$ Hz), 2.79 (1H, dd, $J = 13.6, 7.0$ Hz), 3.01 (1H, d, $J = 18.1$ Hz), 3.05 (1H, d, $J = 18.1$ Hz), 5.01 (1H, t, $J = 7.0$ Hz), 5.40 (1H, s), 6.37 (1H, s); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz): δ 37.6 t (C1), 175.0 s (C2 and C11), 179.2 s (C4), 58.8 s (C5), 85.1 d (C6), 43.3 t (C7), 87.5 s (C8), 67.0 s (C9), 69.9 d (C10), 101.3, d (C12), 27.3 q [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 38.7 s [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$].

Ginkgolide A; FAB $^+$ -MS: 409(100), 393(13), 185(10), 93(37), 57(81); UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$: 218 nm; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 1.80(H1 alpha), δ 2.75(H1 beta), δ 4.83(H2), δ 4.92(H6), δ 2.05(H7 alpha, beta), δ 1.72(H8), δ 4.92(H10 alpha), δ 6.02(H12), δ

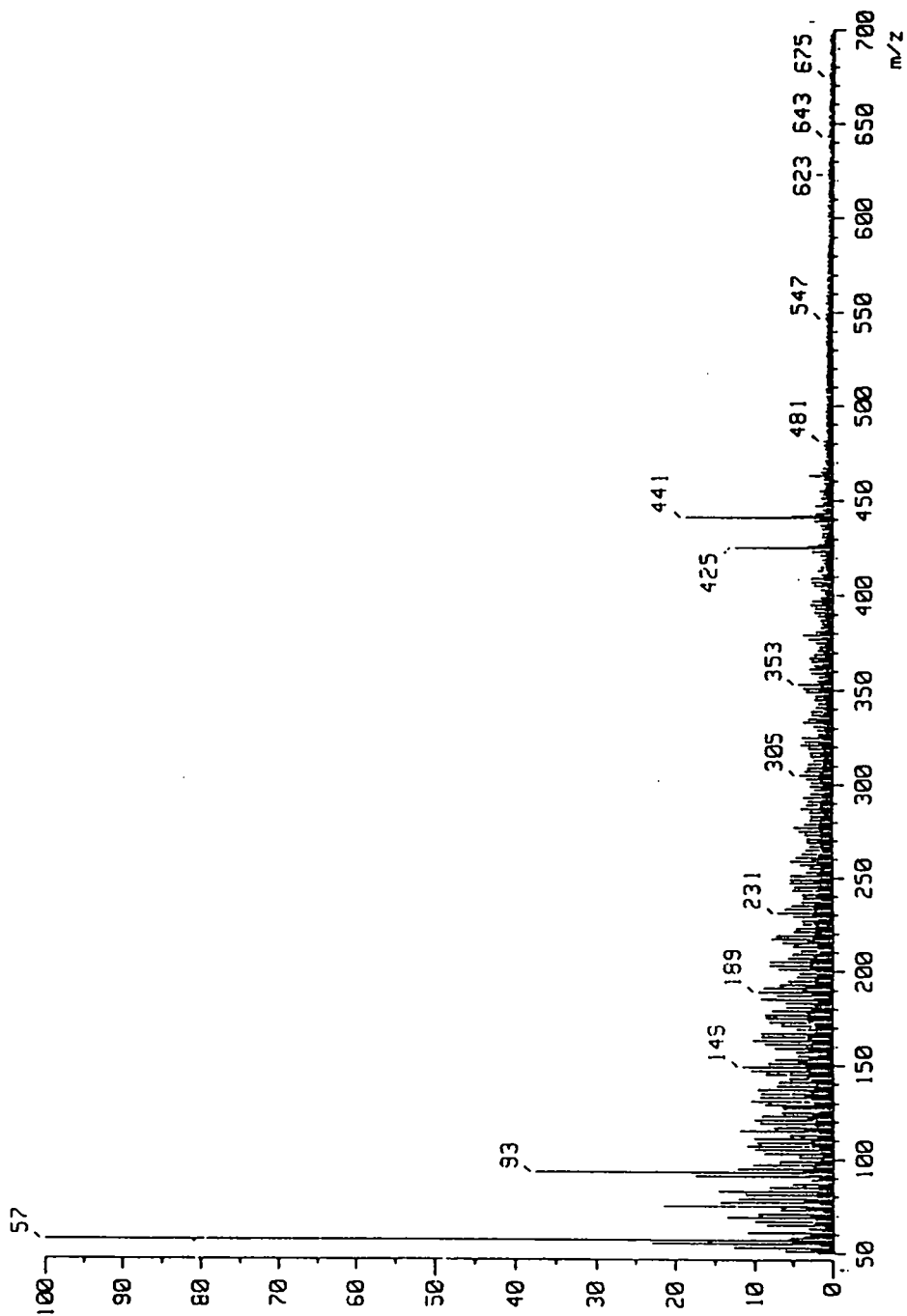


Fig. 1.4. Mass spectrum of ginkgolide C.

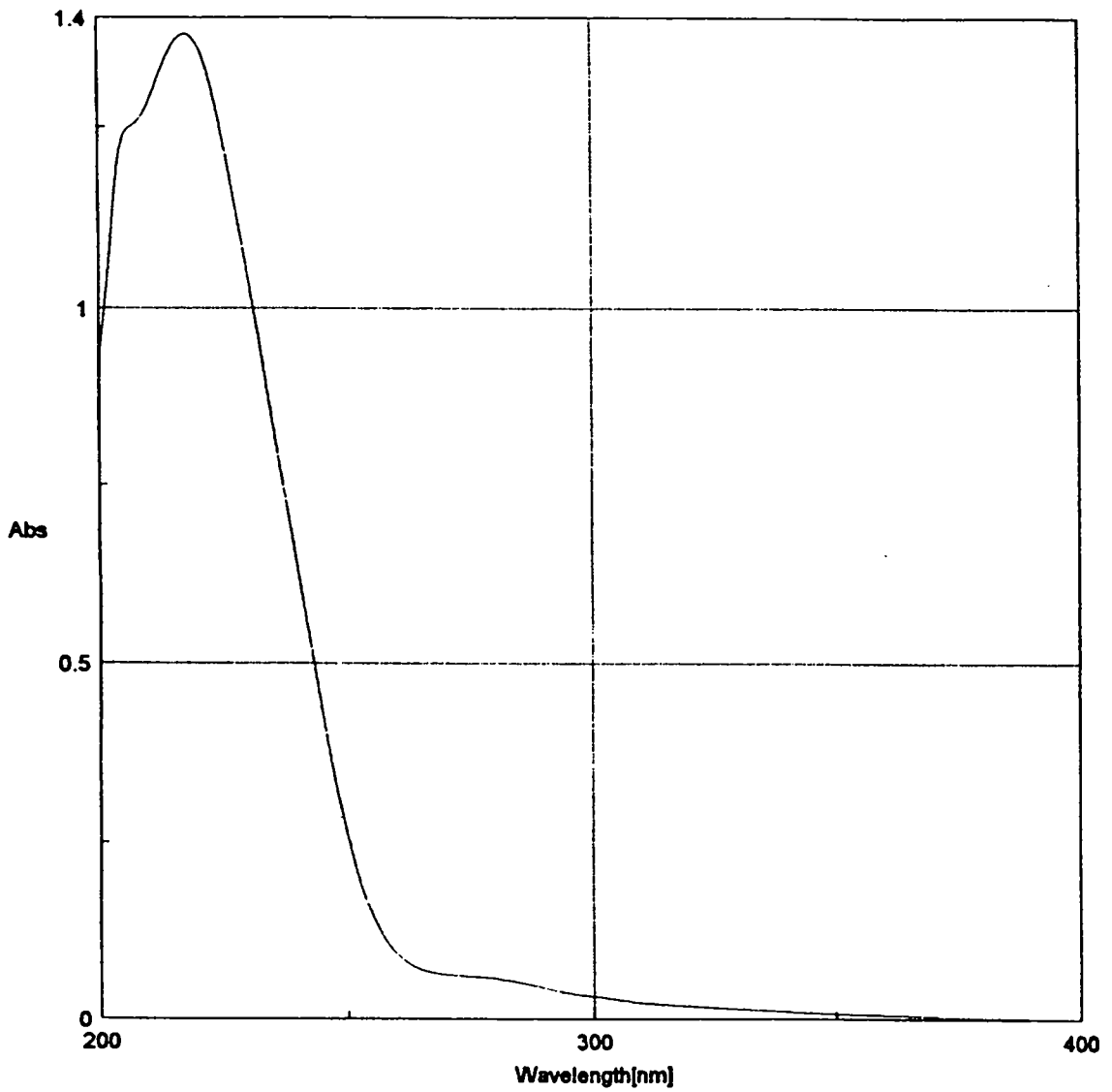


Fig.1.5. UV spectrum of ginkgolide C.

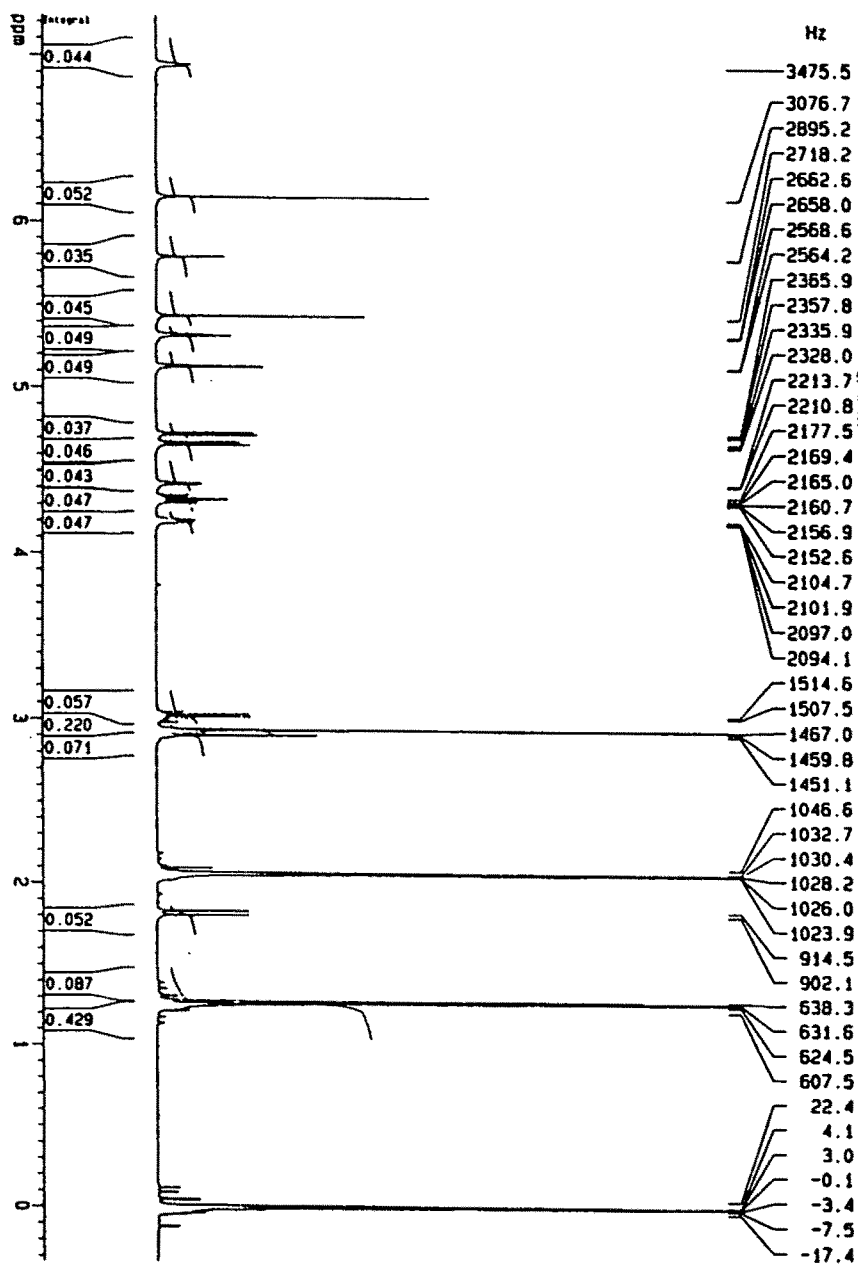


Fig. 1.6. ¹H-NMR spectrum of ginkgolide C.

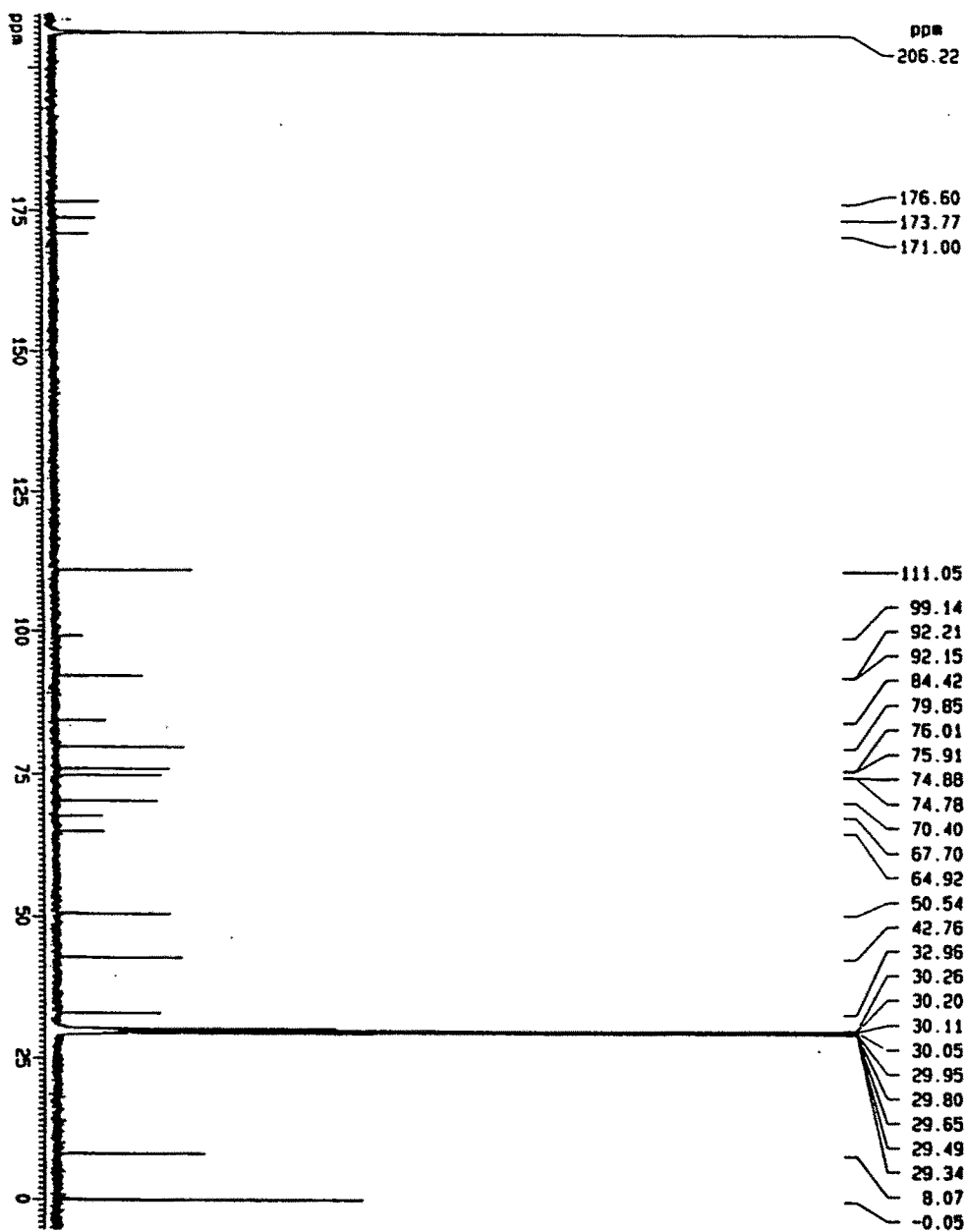


Fig.1.7. ^{13}C -NMR spectrum of Ginkgolide C.

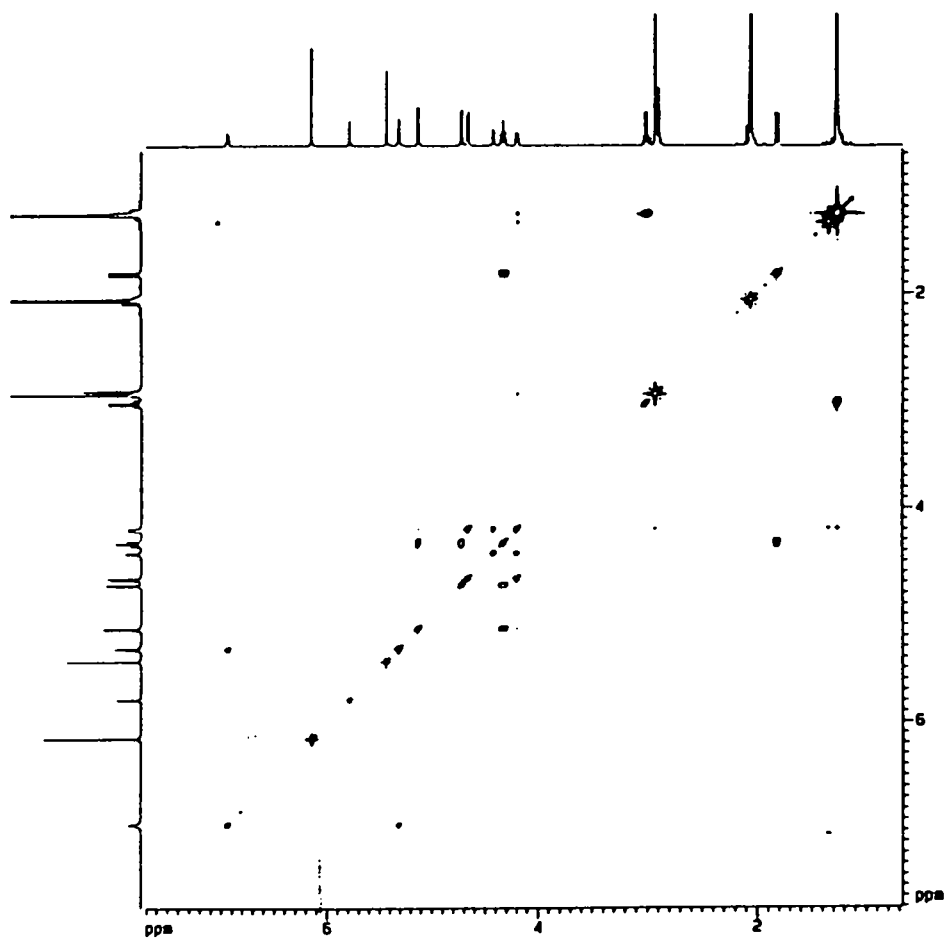


Fig. 1.8. ^1H - ^1H cosy spectrum of Ginkgolide C.

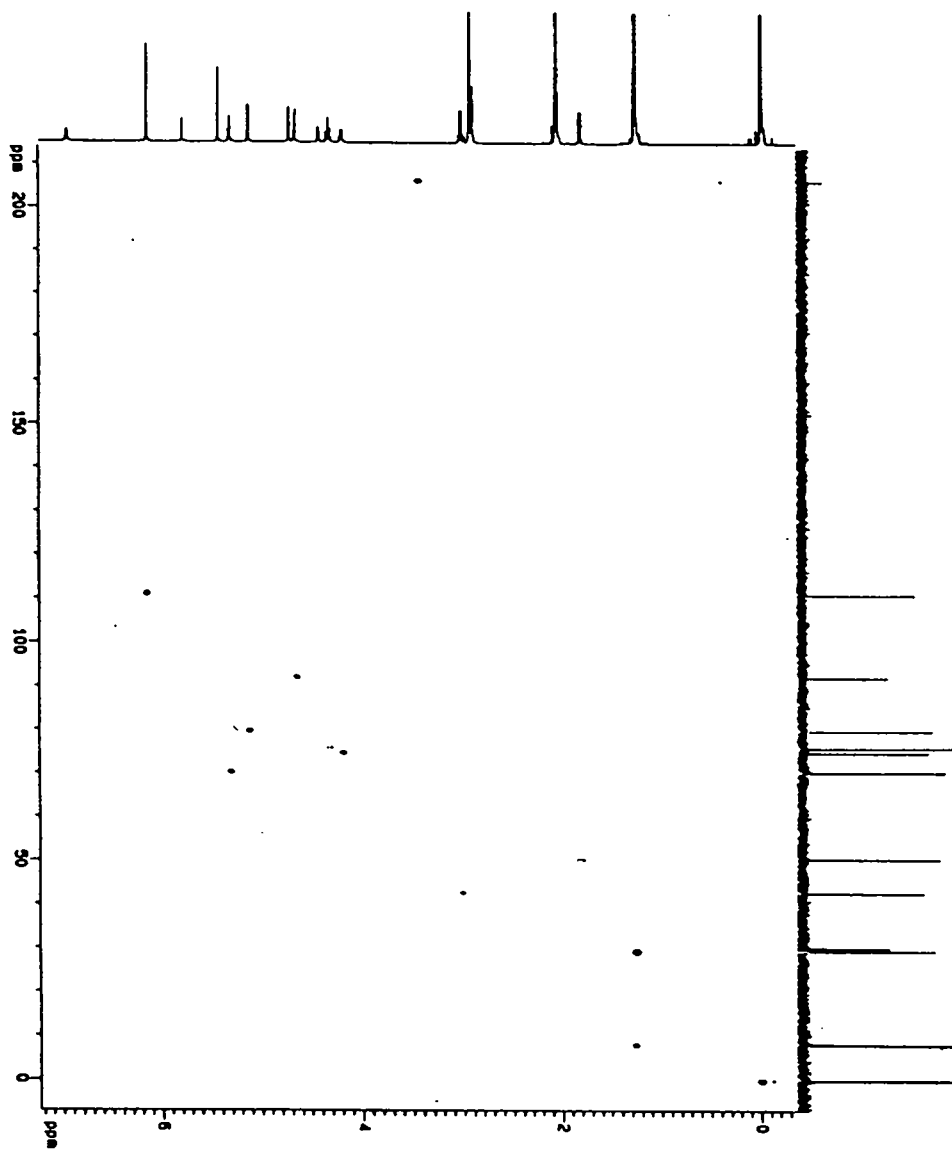


Fig.1.9. ^1H - ^{13}C cosy spectrum of Ginkgolide C.

2.93(H14), δ 1.02(*t*-Bu), δ 1.18(H16), δ 6.38(OH3), δ 6.81(OH10); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 36.01(C1), δ 85.20(C2), δ 68.14(C3), δ 100.33(C4), δ 86.14(C5), δ 87.77(C6), δ 36.39(C7), δ 48.65(C8), δ 66.90(C9), δ 68.91(C10), δ 174.37(C11), δ 109.57(C12), δ 170.84(C13), δ 80.50(C14), δ 176.64(C15), δ 8.24(C16), δ 28.95(C18, 19, 20).

Ginkgolide B; FAB⁺-MS: 425(70), 361(10), 185(28), 93(100), 57(80); UV $\lambda^{\text{MeOH}}_{\text{max}}$: 218 nm; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 4.04(H1 beta), δ 4.61(H2), δ 5.30(H6), δ 1.93(H7 alpha), δ 2.14(H7 beta), δ 1.72(H8), δ 5.02(H10 alpha), δ 6.07(H12), δ 2.84(H14), δ 1.03(*t*-Bu), δ 1.11(H16), δ 6.47(OH3), δ 7.47(OH10), δ 4.92(OH1); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 73.87(C1), δ 91.68(C2), δ 83.01(C3), δ 98.55(C4), δ 71.79(C5), δ 78.68(C6), δ 36.71(C7), δ 48.65(C8), δ 67.52(C9), δ 69.16(C10), δ 174.01(C11), δ 109.72(C12), δ 170.35(C13), δ 41.62(C14), δ 176.47(C15), δ 7.93(C16), δ 28.96(C18, 19, 20).

Ginkgolide C; FAB⁺-MS: 440(19), 425(13), 149(11), 93(37), 57(100); UV $\lambda^{\text{MeOH}}_{\text{max}}$: 218 nm; ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 3.98(H1 beta), δ 4.62(H2), δ 4.96(H6), δ 4.04(H7 alpha), δ 1.54(H8), δ 4.99(H10 alpha), δ 6.10(H12), δ 2.81(H14), δ 1.09(*t*-Bu), δ 1.10(H16), δ 6.48(OH3), δ 7.54(OH10), δ 4.97(OH1), δ 5.66(OH7); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 73.65(C1), δ 91.93(C2), δ 82.92(C3), δ 98.25(C4), δ 66.42(C5), δ 79.05(C6), δ 74.00(C7), δ 48.99(C8), δ 63.76(C9), δ 68.98(C10), δ 173.90(C11), δ 109.52(C12), δ 170.57(C13), δ 41.56(C14), δ 176.40(C15), δ 7.93(C16), δ 28.95(C18, 19, 20).

은행잎 성분 trilactone diterpenoids (ginkgolides A, B, C)와 유기인계 살충제인 diazinon 및 카바메이트계 살충제인 carbofuran과 fenobucarb의 감수성 계통 벼멸구에 대한 살충력을 미량국소처리법으로 비교하였다(표 1.12). 살충력의 크기는 ginkgolide C>ginkgolide B>ginkgolide A의 순으로 나타났으며, ginkgolide C는 기존의 살충제들 가운데 diazinon과 비슷한 살충력을 나타내었으나, ginkgolide A와 ginkgolide B는 살충력이 조금 떨어짐을 알 수 있었다.

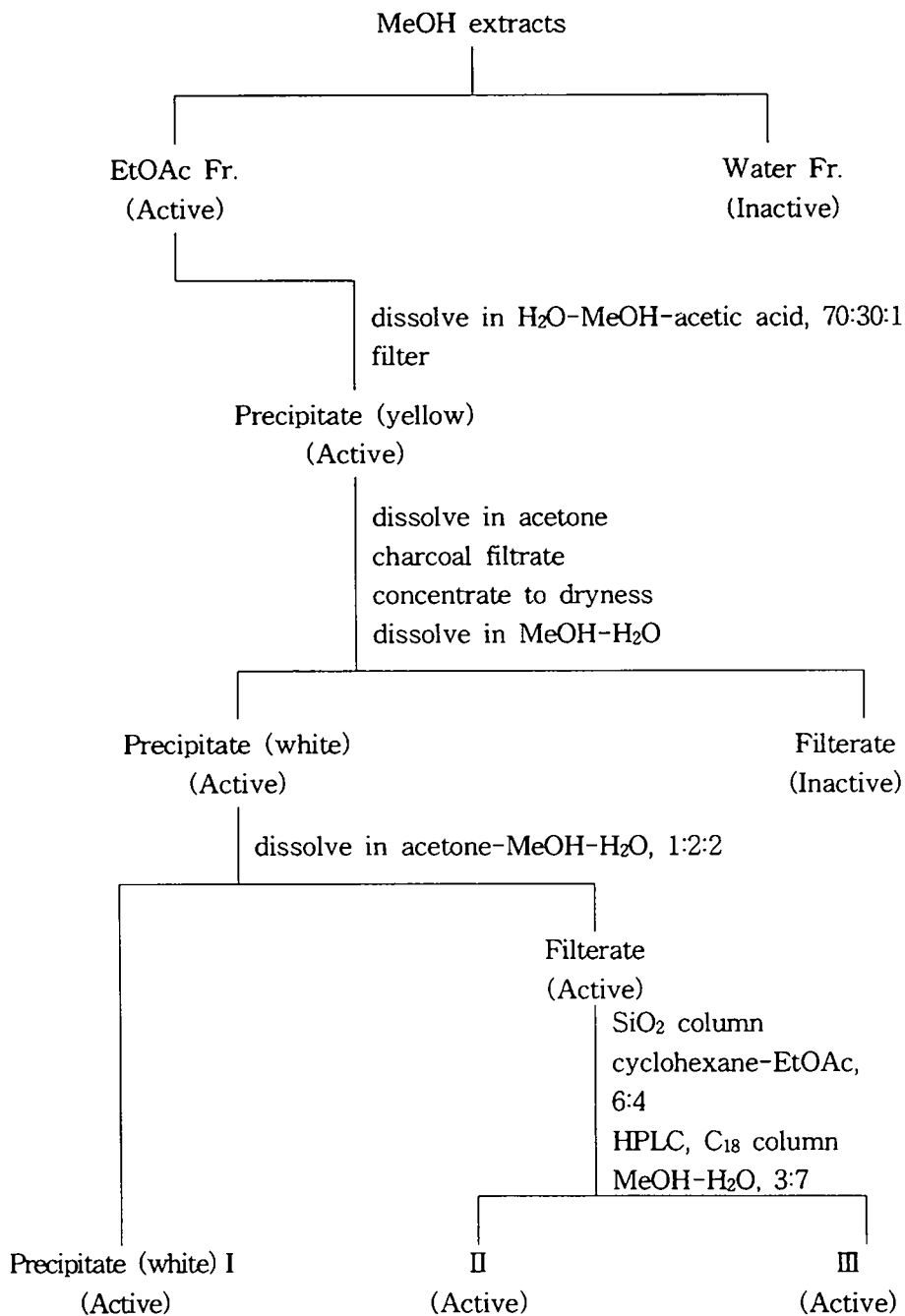
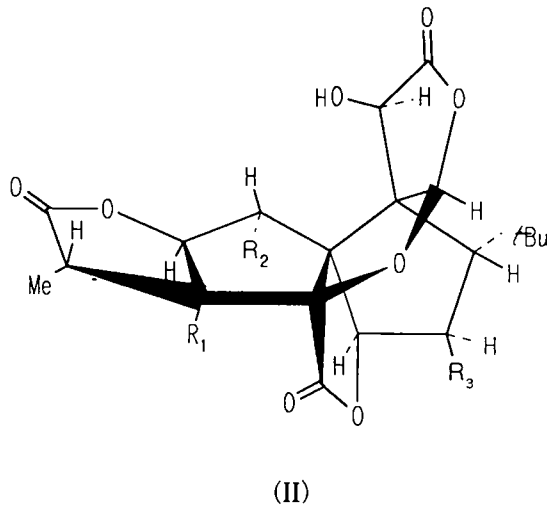
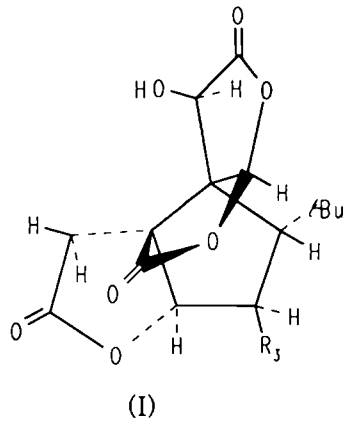


그림 1.10. 은행 잎 살충성분인 trilactone terpenoid 화합물의 대량생산법.



	R ₁	R ₂	R ₃
Ginkgolide A	OH	H	H
Ginkgolide B	OH	OH	H
Ginkgolide C	OH	OH	OH

그림 1.11. 은행잎의 살충성분인 bilobalide (I), ginkgolides A, B and C (II)의 구조

표 1.12. 은행 잎 성분의 감수성 계통의 버밀구에 대한 살충활성

화 합 물	기 율 기 (± SE)	LD ₅₀ (ng/우) (95% CL)	상대독성 ^a
Bilobalide	2.71 (± 0.39)	0.26(0.19 - 0.35)	12.31
Ginkgolide A	2.27 (± 0.22)	64(55 - 73)	0.05
Ginkgolide B	1.81 (± 0.16)	16(14 - 19)	0.20
Ginkgolide C	2.29 (± 0.18)	9.5(8.2 - 10)	0.34
Diazinon	2.72 (± 0.81)	7.6(3.9 - 10.0)	0.42
Carbofuran	2.80 (± 0.56)	1.8(1.3 - 2.4)	1.78
Fenobucarb	2.75 (± 0.69)	3.2(2.3 - 4.6)	1.00

^aFenobucarb의 LD₅₀ 값을 1로 하였음(1.00).

3. Bilobalide의 아세틸콜린에스테라제(AChE) 저해활성

은행잎의 강한 살충성분인 bilobalide의 살충작용 메카니즘을 조사하기 위하여 AChE 저해제인 paraoxon과 비교하였다 (표 1.13). 유기인제인 paraoxon은 AChE를 강하게 저해하였으나 (I₅₀, 0.403), bilobalide는 AChE를 저해하지 않았다. 이러한 결과로부터 bilobalide는 신경에 작용하는 것으로 판단되었다.

표 1.13. 공시화합물의 AChE 저해활성

Compound	I ₅₀ (1 × 10 ⁻⁵ M)
Paraoxon	0.403
Bilobalide	1.031

4. Ginkgolide C와 Bilobalide의 독성

은행 잎의 살충성분인 ginkgolide C와 bilobalide의 생쥐에 대한 급성독성을 표 1.14에 나타내었다. 이들 화합물들은 LD₅₀ 값이 1000 mg/kg으로 포유류에 대한 독성이 대단히 낮았다.

표 1.14. 은행잎 성분의 생쥐에 대한 급성독성

Compound	LD ₅₀ (mg/kg)
Ginkgolide C	1000
Bilobalide	1000

5. 돌연변이원성

대사활성계(S-9 mix)의 존재 및 비존재하에서 histidine 영양요구성 균주인 *Salmonella typhimurium* TA-1535, TA-1537, TA-98 및 TA-100을 이용하여 강한 살충효과를 보인 ginkgolide C 500 μ g/plate를 최고 농도로 하고 31.2~500 μ g/plate의 5 단계 농도에서의 복귀돌연변이원성 실험을 실시하여 그 결과를 표 1.15에 나타내었다. TA-1535 및 TA-100 균주의 양성대조군인 Sodium azide(SA) 처리구와 TA-1537 균주의 양성대조군인 9-Aminoacridine(9-AA) 처리구 및 TA-98 균주의 양성대조군인 2-Aminofluorene(2-AF) 처리구에서는 각각 복귀돌연변이 콜로니수가 유의적인 증가를 나타낸 반면, ginkgolide C 처리구는 시험한 모든 균주의 전농도군에 걸쳐서 처리량 증가에 따른 복귀돌연변이 콜로니수의 유의적인 증가가 관찰되지 않았고, 또한 음성대조물질로서 DMSO만을 처리한 처리구와도 거의 비등한 수의 콜로니가 관찰되었다. 따라서, ginkgolide C는 본시험 조건하에서 *S. typhimurium* TA-1535, TA-1537, TA-98 및 TA-100의 4개 시험균주에 대해 His⁻ → His⁺로의 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 판단되었다.

울금의 살충 살균활성물질인 ar-tumerone은 *S. typhimurium* TA-1535, TA-1537 TA-98 및 TA-100의 4개 시험균주에 대해 돌연변이를 유발하였다.

표 1.15. Ginkgolide C의 *Salmonella typhimurium* 균주에 대한 돌연변이원성*

Test strain	Test article	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	-S-9	+S-9
			Mean \pm SD	Mean \pm SD
TA1535	Ginkgolide C	0	17 \pm 4	24 \pm 4
		31.2	19 \pm 5	23 \pm 3
		62.5	23 \pm 4	19 \pm 2
		125	19 \pm 6	27 \pm 7
		250	16 \pm 11	29 \pm 3
		500	22 \pm 1	26 \pm 6
TA1537		0	4 \pm 4	18 \pm 1
		31.2	5 \pm 6	17 \pm 2
		62.5	6 \pm 7	19 \pm 3
		125	11 \pm 2	22 \pm 4
		250	6 \pm 3	15 \pm 3
		500	11 \pm 1	11 \pm 7
TA98		0	36 \pm 5	45 \pm 6
		31.2	30 \pm 10	39 \pm 3
		62.5	32 \pm 3	41 \pm 4
		125	25 \pm 7	46 \pm 2
		250	27 \pm 4	43 \pm 4
		500	37 \pm 7	46 \pm 3
TA100		0	98 \pm 6	110 \pm 5
		31.2	95 \pm 10	120 \pm 10
		62.5	83 \pm 2	132 \pm 4
		125	110 \pm 1	134 \pm 11
		250	112 \pm 5	142 \pm 11
		500	98 \pm 6	119 \pm 17
TA1535		1	430 \pm 63	
TA1537		50	190 \pm 32	
TA98		1		527 \pm 45
TA100		1	514 \pm 12	

* Data are Mean \pm SD from 3 plates.

** Sa; Sodium azide, 9AA; 9-aminoacridine, 2AF; 2-aminofluorene

고찰

살충제는 농업해충의 방제에 의한 식량증산 및 위생해충의 구제에 의한 인류의 보건향상에 크게 기여하였으나 살충제의 연용과 남용은 많은 부작용을 야기하여, 차후 인축 및 환경에 저독성인 새로운 살충제의 개발이 시급한 실정에 있다. 새로운 살충제를 개발하는 방법에는 크게 화학적 합성에 의한 방법과 천연물로부터 살충성분을 분리하여 직접 이용하거나 그것을 모핵으로 하여 새로운 살충제를 개발하는 방법이 있다. 그러나 화학적 합성에 의한 방법은 1/20,000~1/50,000이라는 희박한 성공확률과 10~15년이라는 오랜 개발 소요시간 및 막대한 비용의 투입(永江, 1987)이라는 문제로 인해 선진제국은 이미 식물, 동물 및 미생물과 같은 천연물로부터 개발하는 방법에 노력을 집중하고 있다. 특히 식물체가 함유한 살충성분의 탐색은 새로운 살충제 개발에 있어서 중요한 의미를 가진다. 본 연구는 국내산 170종 식물체 및 인도산 50종 식물체의 메탄올 조추출물을 벼멸구의 6종의 주요해충을 대상으로 살충활성을 탐색하여, 천연물유래 살충제 개발의 기초자료를 얻기 위해 실시하였다.

공시식물체 220종의 주요 유해생물 7종에 대한 살충활성 스크리닝 결과, 벼멸구의 경우, 은행나무잎에서 100%, 초피나무 수피, 편백 잎, 비목나무 잎 추출물에서 95% 이상의 살충율을 나타내었고, 정향, 후추, 천궁, 울금, 검은재나무, 곰의말채, 굴피나무, 말채나무, 백목련, 비자나무, 늘보리, 흑향미에서 80-90%의 살충율이 관찰되었다. 배추좀나방에 대해서는 후추, 천궁, 울금, 개벗나무, 검은재나무, 고추나무, 곰의말채, 괴물나무, 굴피나무, 까치박달, 담팔수, 돈나무, 때죽나무, 말채나무, 먼나무, 비자나무, 초피나무 수피등에서 80% 이상의 사충율을 보였다. 쌀바구미와 콩바구미의 경우, 처리 72시간 후에는 목단피, 정향 그리고 석창포가 쌀바구미에 대해 살충활성을 나타내었다. 점박이용애에 대해서는 보리밥나무 잎, 광대싸리 잎 + 줄기, 두릅나무 잎, 초피나무 수피, 참가시나무 잎과 모새나무 잎, 개벗나무, 검은재나무, 곰의말채, 괴물나무, 구실잣밤나무, 굴피나무, 다정큼나무, 담팔수, 돈나무, 때죽나무, 말채나무, 먼나무, 모람, 무환자나무, 백목련, 비자나무등에서 80%의 살충활성을 나타내었다. 또한, 인도산 식물체

Cassia tora 외 49종의 3종 주요 농업해충에 대한 살충스크리닝 결과, *Annona squamosa* 종자, *Adhotoda vasica* 잎, *Nerium indicum* 줄기, *Pongamia pinnata* 종자 추출물이 벼멸구, 배추좀나방, 복숭아혹진딧물에 대하여 90% 이상의 살충효과를 보였다. Jacobson(1989)은 식물성 살충제의 출처로서 Meliaceae, Rutaceae, Asteraceae, Annonaceae, Labiatae, Canellaceae과에 속하는 식물체들이 유망하다고 하였다.

울금 및 은행나무잎의 메탄올추출물을 각종 chromatography를 이용하여 분리, 정제하여 살충활성 성분을 각종 spectral techniques을 이용하여 동정한 결과 울금의 경우 *ar*-turmerone, 은행잎의 경우 trilactone sesquiterpene인 bilobalide 및 trilactone disesquiterpene인 ginkgolide C로 구조결정하였다. *ar*-Turmerone 및 bilobalide의 살충활성 성분으로서의 보고는 본 연구에서 처음으로 밝혀졌다.

울금은 여러해살이 풀로서 보통 덩이뿌리를 칭하는데, 한방에서는 이담, 위액분비 촉진, 이뇨촉진제로서 응용하고 있다(문, 1991). 특히 뿌리내에는 정유성분이 많은데, 본 연구에서 밝힌 살충활성 성분인 *ar*-turmerone은 매우 불안정한 성분으로서 쉽게 turmerone 으로서 이성화되며 울금의 독특한 냄새물질로 대표된다. *ar*-Turmerone의 벼멸구 및 배추좀나방에 대한 살충활성은 1000 및 2000 ppm 농도에서 100% 활성을 보였고, 500 ppm에서는 각각 60%와 81%의 살충활성을 보였다. 또한 토마토역병과 밀녹병에 대하여 100% 살균활성을 나타내었고, 500 ppm에서는 90%의 살균활성을 보여 새로운 용도로서 이용 가능성을 시사하고 있다.

“화석식물(fossil plant)”이라고도 부르는 은행나무는 암·수나무가 각각 다른 낙엽성 교목으로서 1,000년 이상을 사는 장수목으로 알려져 있다. 오랜 세월을 각종 병해충에 대해 아무런 피해를 입지 않고 살아가기 때문에 오래 전부터 연구의 대상이 되어왔다. 白果라고 부르는 열매는 식용 및 진해·거담제로서 옛부터 한방에서 널리 이용되어 왔는데, 그러나 열매를 너무 많이 먹으면 청산(cyanic acid) 배당체가 위내에서 분해되어 청산중독을 일으켜 경련, 구토, 의식장애등의 증세가 나타난다고 알려졌으며, 부채꼴 모양의 잎은 관상동맥의 혈류장애를 개선하며 혈전의 예방 및 치료에 효과가

있는 것으로 알려졌으며(鄭, 1990; 文, 1991), 혈류개선제 의약품으로 상품화되어 시판되고 있다. 이와같이 은행나무의 약리작용에 대해서는 많이 연구보고되어 있으나 살충활성에 대해서는 알려진 바가 없다. 본 연구에서 벼멸구 살충성분인 bilobalide와 ginkgolide C는 trilactone sesquiterpene의 구조를 가지고 있어 기존의 살충제와는 전혀 다른 구조를 가지고 있다. Bilobalide의 벼멸구에 대한 살충효과는, 분무법의 경우 diazinon, BPMC, carbofuran에 비하여 각각 3.1배, 1.8배, 1.3배 강하였다. 미랑국소처리법에서는 BPMC보다 8.7배 강한 살충효과를 나타내었고, carbofuran과는 비슷한 살충력을 나타내었다.

Bilobalide 0.01 μg 를 0.2 μl 의 아세톤에 용해하여 벼멸구 성충의 흉부배판에 미랑국소처리한 후 유묘가 든 시험관에 넣어주면 처음에는 유묘의 줄기를 타고 올라가 흡즙을 시작하였으나, 처리 20여분 경과 후부터 흉부와 복부에 심한 경련을 일으키면서 바닥으로 떨어졌다. 떨어진 벼멸구는 다리를 심하게 경련하는 증상을 잠시 보이지만 차츰 약한 경련으로 변하면서 처리 30여분이 경과되면서 대부분 치사해 버렸다. 0.2 μl 의 아세톤만을 국소처리한 대조구의 벼멸구는 이러한 증상을 보이지 않고 유묘의 고사를 일으킬 때까지 계속 흡즙하였다. 이와같은 bilobalide의 속효성 살충효과 및 중독증상은 카바메이트계 살충제인 BPMC나 carbofuran 및 피레스로이드의 그것과 거의 유사한 것으로서, bilobalide의 살충메카니즘은 BPMC나 carbofuran의 경우처럼 아세틸콜린에스테라제를 저해하지 않기 때문에 피레스로이드와 같이 신경에 작용하는 것으로 추측된다.

식물이 가진 살충성 2차대사물을 모핵화합물로 하여 새로운 살충제 개발에 성공한 경우는, 아프리카산 콩과식물의 일종인 *Physostigma venenosum* 종자에서 단리한 독성분인 physostigmine이 acetylcholinesterase를 특이적으로 저해한다는 사실이 확인되어 처음에는 의약적 이용을 목적으로 하여 유도체합성을 시도하였다. 그 이후 physostigmine의 독성기인 *N*-methyl carbamoyl기 유도체중 수용성염 유도체가 곤충 피부 투과성의 문제로 인하여 살충력이 거의 없는 반면, 지용성 유도체에서는 그런 문

제가 해결되어 많은 곤충에 대해 높은 살충력이 있음이 발견되어(Metcalf와 March, 1950), 카바메이트계 살충제로의 개발이 급속도로 진전되어 1952년 스위스 Geigy사에서 최초로 Pyrolan이 개발되었고, 계속해서 carbaryl, BPMC, isoprocarb, methomyl, carbofuran, aldicarb 등이 개발되었다(Kuhr와 Dorough, 1976).

또한, 제충국의 꽃에 함유된 살충성분인 pyrethrin은, DDT와 마찬가지로 곤충신경계의 축색막에서의 K^+ , Na^+ ion의 막투과성에 영향을 주어 정상적 신경자극의 전달을 방해하여 치사시키는 살충메카니즘을 가지기 때문에(Narahashi등, 1976) 탁월한 속효적 knockdown효과를 갖는다. 따라서 천연피레스로이드보다 월등한 살충력과 화학적 안정성을 가진 화합물을 찾기 위해 유도체합성이 행해졌으며 그 결과 Schechter등(1949)에 의해서 최초의 합성피레스로이드인 allethrin이 개발되었고, 계속해서 deltamethrin, permethrin, cypermethrin, fenvalerate등이 개발되어 모기, 파리 구제용 모기향이나 에어로졸등의 가정용 살충제와 진딧물, 나비목 유충등의 농업해충을 방제하기 위한 살충제로 지금도 전세계적으로 광범위하게 사용되고 있다(Elliot와 Janes, 1973).

본 연구결과 *ar*-turmerone은 살충활성 뿐만 아니라 살균제로서 응용가능성을 갖고 있으며, 정향의 eugenol과 isoeugenol은 배추좀나방과 쌀바구미에 대해 높은 살충활성을 나타내었다. 그리고 bilobalide와 ginkgolide C는 벼멸구에 대하여 기존의 벼멸구 방제용 살충제(BPMC, carbofuran)와 비교하여 탁월한 살충효과를 보일 뿐 아니라, 기타 공시충에 대해서는 특이할만한 살충활성을 보이지 않아, 은행나무잎의 살충성분은 해충에 대해서 높은 선택적 살충활성을 갖는 것으로 나타났다. 또한, 급성독성이 낮을 뿐 아니라(LD₅₀, 1000 mg 이상) 돌연변이원성의 위험성이 없는 등 안전성면에서도 우수하기 때문에 실제 포장에서의 이용가능성이 기대된다. 그러나 trilactone sesquiterpene의 복잡한 구조를 가지고 있기 때문에 실제 합성시에 어려움이 예상되는바, 이를 해결하기 위해서는 bilobalide 구조상의 어느 부위가 살충력을 발휘하는지를 검토하여 그것을 모핵으로 하여 신규 살충제를 개발할 수 있을 것으로 생각된다.

차후 *ar-turmerone*과 *eugenol*, *isoeugenol*의 경우 살충메카니즘구명 및 살균제로서 이용가능성 타진에 대한 연구가 수행되어야 할 것으로 생각되고, *bilobalide*의 경우 벼멸구에 대한 살충메카니즘 구명, 벼멸구와 타곤충과의 선택독성 및 유용곤충에 대한 영향 등에 관한 연구가 포괄적으로 수행되어야 할 것이다.

IV. 인용문헌

안용준, 조광연. 1992. 살충제 개발을 위한 생물검정법의 확립. I. 각종 유기용매가 곤충의 독성과 약해 및 화합물의 용해성에 미치는 영향. 한국응용곤충학회지 31: 182-189.

안용준, 김길하, 박노중, 조광연. 1992. 살충제 개발을 위한 생물검정법의 확립. II. 처리방법 및 종간에 따른 살충제 감수성 차이. 한국응용곤충학회지 31: 452-460.

Arnason, J. T., B. J. R. Philogène and P. Morand. 1989. Insecticides of Plant Origin(Ed.). ACS symp. Ser. 387. Am. Chem. Soc., Washington, D.C.

Bowers, W. S., H. M. Fales, M. J. Thompson and E. C. Uebel. 1966. Juvenile hormones: Identification of an active compound from Balsam Fir. Science 154: 1020-1021.

Brown, A. W. A. 1978. Ecology of Pesticides. 525 pp. John wiley & Sons, New York.

Carson, R. L. 1962. Silent Spring. 368 pp. Houghton Mifflin, Boston.

정필근. 1990. 생약초. 262 pp. 홍신문화사. 서울.

조광연, 안중웅, 안용준. 1987. 신규농약개발을 위한 스크리닝체제 확립, pp. 501-724. 과학기술처.

永江祐治. 1987. 農業問題と農業開發指標. pp. 172-217. 新農藥開發と市場展望. CMC株式會社(編), 東京.

Elliot, M. 1976. Synthetic pyrethroids. pp. 1-28. *In* Synthetic pyrethroids, ed. by M. Elliot. ACS Symp. Ser. 42, Am. Chem. Soc., Washington, D. C.

Elliott, M. and N. F. Janes. 1973. pp. 56-100. *In* The Lectins: Properties, functions and applications in biology and medicine, eds. by I. E. Liener, N. Sharon and I. J. Goldstein. Academic Press, New York.

Jacobson, M. 1989. Botanical pesticides: past, present, and future, pp. 1-10. *In* insecticides of Plant Origin, eds. by J. T. Arnason, B. J. R. Philogene and P. Morand. ACS Symp. Ser. No. 387, Am. Chem. Soc., Washington, D. C.

金澤 純. 田中二良. 1979. 水生生物と農藥. 208 pp. サイエнтиスト社, 東京.

Kuhr, R. J. and H. W. Dorough. 1976. Carbamate Insecticides: Chemistry, Biochemistry and Toxicology. 300 pp. CRC Press, Cleveland.

Lee, H. S., J. O. Lee, H. K. Lee, J. H. Oh and Y. J. Ahn. 1998. Cytotoxic activity

of Leguminous seed extracts against Human tumor cell lines. *Agric. Chem. Biotechnol.* 41: 246-250.

Lee, H. S. and Y. J. Ahn. 1997. Enzymes of carbohydrate metabolism in cowpea(*Vigna unguiculata* L. Walp. cv. Caloona) nodules. *Agric. Chem. Biotechnol.* 41(4): 222-227.

Metcalf, R. L. and R. B. March. 1950. Properties of acetylcholine esterases from the bee, the fly and the mouse and their relation to insecticide action. *J. Econ. Entomol.* 43: 670-677.

Metcalf, R. E. 1980. Changing role of insecticides in crop protection. *Ann. Rev. Entomol.* 25: 219-256.

Miyakado, M. 1986. The search for new insecticidal and fungicidal compounds from plants. *J. Pesticide Sci.* 11: 483-492 (In Japanese with English summary).

문관심. 1991. 약초의 성분과 이용. 755 pp. 일월서각, 서울.

Narahashi, T., K. Nishimura, J. L. Parmentier, K. Takeno and M. Elliott. 1976. Neurophysiological study of the structure-activity relation of Pyrethroids, pp. 85-97. *In Synthetic Pyrethroids*, ed. by M. Elliot. ACS Symp. Ser. 42, Am. Chem. Soc., Washington, D. C.

Sakai, M. 1966. Studies on the insecticidal action of nereistoxin, 4-*N,N*-

dimethylamino-1,2-dithiolane. II. Symptomology. *Botyu-Kagaku* 31: 53-61.

Schechter, S., N. Green and F. B. Laforge. 1949. Constituents of pyrethrum flowers XXIII. Cinerolone and the synthesis of related cyclopentenolones. *J. Amer. Chem Soc.* 71: 3165-3173.

鈴木幸男, 宮本純之. 1980. 最新農薬概論. 382 pp. 廣川書店, 東京.

湯嶋 健, 桐谷圭治, 金澤 純. 1973. 生態系と農薬. 214 pp. 岩波書店, 東京.

Wigglesworth, V. B. 1945. DDT and the balance of nature. *Atlantics Mon.* 176: 107.

Williams, C. W. 1967. Third-generation pesticides. *Sci. Am.* 217: 13-17.

ABBOTT, W.S. (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.

AHN, Y.J., H.M. PARK, J.K. YOO and J.O. LEE (1993) Mechanisms of resistance to insecticides in the brownplanthopper (*Nilaparvata lugens*) and strategies for its management. In *International Workshop: Establishment, Spread, and Management of the Rice Water Weevil and Migratory Rice Insect Pests in East Asia* (K. HIRAI, ed.). Nat. Agric. Res. Cent., Tsukuba, Japan, pp. 275-291.

ALKOFAHI, A., J.K. RUPPRECHT, J.E. ANDERSON, J.L. MCLAUGHLIN,

K.L. MIKOLAJCZAK and B.A. SCOTT (1989) Search for new pesticides from higher plants. In *Insecticides of Plant Origin* (J.T.

ARNASON, B.J.R. PHILOGENE and P. MORAND, eds.). ACS Symposium Series No. 387, Amer. Chem. Soc., Washington, D.C., pp. 25-43.

ARNASON, J.T., B.J.R. PHILOGENE, P. MORAND, K. IMRIE, S. IYENGAR, F. DUVAL, C. SOUCY-BREAU, J.C. SCAIANO, N.H. WERSTIUK, B. HASSPIELER and A.E.R. DOWNE (1989) Naturally occurring and synthetic thiophenes as photoactivated insecticides. In *Insecticides of Plant Origin* (J.T. ARNASON, B.J.R. PHILOGENE and P. MORAND, eds.). ACS Symposium Series No. 387, Amer. Chem. Soc., Washington, D.C., pp. 164-172.

CHELLIAH, S. and E.A. HEINRICHS (1980) Factors affecting insecticide-induced resurgence of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* on rice. *J. Econ. Entomol.* **9**: 773-777.

CHUNG, T.C., C.N. SUN and C.Y. HUNG (1982) Resistance of *Nilaparvata lugens* to six insecticides in Taiwan. *J. Econ. Entomol.* **75**: 199-200.

DYCK, V.A. and B. THOMAS (1979) The brown planthopper problem. In *Brown Planthopper: Threat to Rice Production in Asia*. Int. Rice Res. Inst., Los Banos, Philippines, pp. 3-17.

ELLIOTT, M. (1977) Synthetic pyrethroids. In *Synthetic Pyrethroids* (E.

ELLIOTT, ed.). ACS Symposium Series No. 42, Amer. Chem. Soc., Washington, D.C., pp. 1-28.

GRAINGE, M. and S. AHMED (1988) *Handbook of Plants with Pest Control Properties*. John Wiley & Sons, London, 470 pp.

HARBORNE, J.B. (1988) *Introduction to Ecological Biochemistry (3rd ed.)*. Academic Press, London, 356 pp.

HEINRICHS, E.A. (1979) Chemical control of the brown planthopper. In *Brown planthopper: Threat to Rice Production in Asia*. Int. Rice Res. Inst., Los Banos, Philippines, pp. 145-167.

JACOBSON, M. and D.G. CROSBY (1971) *Naturally Occurring Insecticides*. Marcel Decker, New York, 585 pp.

KWON, M.; Y.J. AHN, J.K. YOO and B.R. CHOI (1995) Potent Insecticidal activity of *Ginkgo biloba* leaves against *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). *Appl. Entomol. Zool.* 31: 162-166.

KWON, M.; S.B. LEE, Y.J. AHN, N.P. PARK and K.Y. CHO (1994) Insecticidal and acaricidal activities of plant extracts. *Agricultural Chemistry and Biotechnology* 37: 492-497.

MIYAKADO, M., L. NAKAYAMA and N. OHNO (1989) Insecticidal

unsaturated isobutylamides: from natural products to agrochemical leads. In *Insecticides of Plant Origin* (J.T. ARNASON, B.J.R. PHILOGENE and P. MORAND, eds.). ACS Symposium Series No. 387, Amer. Chem. Soc., Washington, D.C., pp. 173-187.

NAGATA, T., T. MASUDA and T. MORIYA (1979) Development of insecticide resistance in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål (Hemiptera: Delphacidae). *Appl. Ent. Zool.* 14: 264-269.

SAXENA, R.C. (1989) Insecticides from neem. In *Insecticides of Plant Origin* (J.T. ARNASON, B.J.R. PHILOGENE and P. MORAND, eds.). ACS Symposium Series No. 387, Amer. Chem. Soc., Washington, D.C., pp. 110-135.

SINGH, R.P. (1990) Neem in Agriculture-Indian scenario. In *Proc Symp. Botanical Pesticides in IPM*. Rajahmundry, pp. 78-119.

VERKERK, R.H.J. and D.J. WRIGHT (1993) Biological activity of neem seed kernel extracts and synthetic azadirachtin against larvae of *Plutella xylostella* L. *Pestic. Sci.* 37: 83-91.

제 2 절 곤충 섭식저해 및 기피활성

I. 서 언

인류는 여전히 제한된 면적에서 식량을 생산하지 않으면 안되고, 아직도 곤충이 매개하는 질병의 위협하에 놓여있다. 따라서 해충방제에 대한 새로운 접근이 필요한데 기존의 속효성, 고독성, 비선택성 살충제에 의한 방제라고 하는 관점에서 점차 완효성이지만 저독성, 선택성을 가지며 생태계에서 부작용을 극소화하는 생태계 조화형으로서의 해충제어물질(bioregulators)에 의한, 해충종합관리(Integrated Pest Management)의 한 부분으로서 바뀌어가는 추세에 있다(Barrons, 1981; Burn등, 1987). 이러한 관점에서 구미, 일본등 선진국들은 오래전부터 개발확률이 매우 낮은 화학적 합성에 의한 살충제 개발에서 생태계에 존재하는 생물 상호간의 작용물질(semiochemicals)의 이용과 응용에 초점을 맞추게 되었으며, 이들을 이용하여 해충의 밀도를 제어하고자 하는 시도가 행하여 지고 있다. 이러한 예로서, 세균(*Bacillus thuringiensis* 등) 및 곤충 바이러스(Nuclear Polyhedrosis Virus, Granulosis Virus, Cytoplasmic Polyhedrosis Virus 등)를 이용한 미생물적 수단(Kang, 1992), 곤충의 pheromone을 이용하는 방법, 그리고 식물에 존재하는 종 특유의 이차대사산물 중 독물질(toxins), 유인물질(attractants), 섭식 또는 산란저해물질(deterrents), 기피물질(repellents) 및 곤충생장조절물질(insect growth regulators)등을 이용하는 방법을 들 수 있다(Nordlund등, 1981).

식물에 함유되어 있는 이차대사산물은 진화상으로 mevalonate를 전구물질로 하는 terpenoid 합성경로, shikimic acid를 전구물질로 하는 phenol 합성경로, 아미노산을 전구물질로 하는 nitrogen 합성경로에 의해서 만들어지며, 이들은 오랜 세월동안 주위의 생물들과 공진화해 오면서(Smith, 1989), 종에 따라 복잡, 다양한 모습으로 발전해왔다(Ehrlich와 Raven, 1964; Smith, 1989). 지구상에는 약 400,000종의 식물종이 있어 각기 독특한 물질을 가지고 있다고 추정해 볼 때, 지금까지 보고된 2차대사산물의 비율은 고작 3~4 % 밖에 안된다(Harborne, 1988)는 결론으로, 아직까지 많은 미지의 활성물질

이 연구해야 할 대상으로 남아 있다.

식물에 존재하는 종 특유의 이차대사산물 중 독물질(toxins), 유인물질(attractants), 섭식 또는 산란저해물질(deterrents), 기피물질(repellents) 및 곤충생장조절물질(insect growth regulators)을 이용하는 방법을 들 수 있는데(Nordlund등, 1981), 이 중에서 천연물 중에서 곤충에 대해 광범위하게 활성을 가지는 것은, 곤충의 섭식을 저지시키는 섭식저해제로서, 이들은 일차적으로 식물을 찾아 다니는 곤충의 감각기관에 영향을 주어 먹이 탐색에 저해를 주며, 이차적으로는 독성을 가지고 있어서 이들의 복합작용에 의해서 섭식저해와 성장저해 등을 일으킨다(Schoonhoven, 1982). 따라서 이와 같은 장점으로 인하여 섭식저해물질은 앞으로 해충종합관리에 유망하게 사용될 수 있는 천연물이라고 생각되고 있다(Bentley, 1984). 단지, 이들의 구조적 복잡성으로 합성에 따른 경제적인 문제를 고려해 볼 때, 그리 쉽게 응용되기는 어려우나, Ley(1990)는 neem tree로부터 분리한 azadirachtin의 구조-활성 상관관계에서 주활성부분인 hydroxydihydrofuran 부분만을 합성하여 *Spodoptera littoralis*에 검정한 결과, 그 결과, 천연의 azadirachtin과 비슷한 활성정도를 얻어 해충종합관리에 있어서 섭식저해물질의 응용 폭을 넓힐 수 있음을 시사한 바 있다.

식물에 존재하는 또 하나의 방어물질은 곤충에 대한 기피물질로서, 탄화수소, 알코올, 알데히드, 에스테르, 정유, 질소화합물 등 200여 종류의 휘발성 물질이 보고되어 있는데(平野, 1971), 이들은 식물과 식물 및 여러 주위 생물들과 복잡, 다양한 상호관계를 가지고 있다. 식물성분 중의 대표적인 휘발성분인 monoterpenoids에서 곤충에 대한 기피활성의 예가 많이 알려져 있는데, 이들 화합물은 세포독성을 가지고 있어서, 골지체와 미토콘드리아의 수 및 세포막의 투과성을 감소시킨다(Harborne등, 1991).

기피성분을 이용하여 상품화로 개발된 예로서, 박하 식물의 일종인 *Mentha pulegium*으로 부터 분리된 pulegone이 알려져 있다. 또한, mugwort (*Artemisia vulgaris*)의 정유성분이 예집트숲모기 (*Aedes aegypti*)에 대한 기피제로 사용되고 있는데, 이들 성분 중에서 linalool, camphor, bornaol, isoborneol, isoboryl acetate 및

terpinen-4-ol 이 강한 기피활성을 나타내며(Hwang, 1985), 이들 화합물은 기피물질로 사용되는 dimethyl phthalate와 비슷한 활성을 나타내었다.

이들 생물 유래의 해충제어 수단중에서 식물체 및 식물의 이차대사산물을 직접 해충 방제에 이용되고 있는데, 오늘날에도 농업해충과 위생해충 방제에 이용되고 있는 pyrethrins는 제충국(*Chrysanthemum cinerariifolium*)의 해충방제제로 널리 이용되고 있는 살충성분이며, 또한 인도 및 아프리카에 서식하는 neem tree(*Azadirachta indica*)의 성분인 azadirachtin은 200여종의 해충에 대하여 강한 섭식저해, 성장저해, 살충력등 광범위한 생리활성을 나타내고 있다(Saxena, 1989).

이와 같이 생리활성천연물은 화학구조로부터 신약창제의 모핵화합물로서 중요한 역할을 하고 있으며 보다 중요한 것은 그의 생합성, 대사, 작용메카니즘의 해명을 통해 생명현상에 대한 이해를 깊게 함으로써 생물 생산성이라는 면에서 폭넓고 새로운 기술의 개발로 이어진다는 점에서 큰 의의가 있다. 또한 호르몬류의 생합성, 대사등에 관한 연구결과 이들에 대한 특이적인 저해제를 외인성의 화합물에서 찾는 것도 새로운 모핵화합물을 발견하는 기회를 높일 것이며 작용메카니즘의 해명은 분자설계에 의한 신약창출의 확률을 증가시킬 것이다 (Ley, 1990).

이러한 활성물질을 가지고 있는 식물을 선정하는 방법으로는 임의적인 채집방법(random collection)과 문헌에 생리활성이 기록되어 있거나 이런 정보들인 구술로 전승되어온 경우 이러한 방법으로 채집하는 방법(anecdotal collection)이 있다(Ramsworth와 Bingel, 1977). Miyakado(1986)는 anecdotal한 채집방법에 의한 농약 개발의 확률과 random한 채집방법에 의한 성공확률이 각각 41.2 %, 23.9 %로서 전자의 발견 확률이 더 높으며, 아열대나 열대지방의 식물과 온대지방의 식물로부터의 탐색 성공확률은 각각 17.8, 0 %정도로 전자가 훨씬 높다.

본 연구는 우리나라의 자생식물 및 한방식물체 총 48종을 임의적인 채집 및 anecdotal collection으로 실시하여 세계적인 주요 나비목 해충인 배추좀나방, 담배거세

미나방 유충, 흰개미에 대한 섭식저해활성물질 및 기피활성물질의 탐색을 통한 식물성 유래 해충방제제 개발을 위해 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 식물체의 추출 및 시료조제

실험 식물체는 지리산, 임업연구원(서울)에서 채집 및 경동시장(서울)에서 구입한 미나리아재비과(Ranunculaceae)의 황련외 47종 중 섭식저해활성 검정용 시료는 실내에서 통풍건조한 후 마쇄기로 갈아서 분말로 만들고나서, 각각의 시료 50 g씩을 500 ml Erlenmeyer flask에 넣고 메탄올 300 ml에 침적시켜 실온 암실하에 3일간 방치하였다. 3일 후에 감압 여과한후 여과액을 진공회전 농축기(EYELA autojack NAF160, Japan)로 40℃에서 감압농축하여 메탄올 조추출물을 얻어 생물검정 시료로 사용하였다.

기피활성 검정용 시료는 식물체 함유 성분들의 휘발을 감소시키기 위하여 밀봉한채로 실험실까지 운반하였으며, 즉시 수증기증류법 (steam distillation method)을 이용하여 추출을 행하였다. 소량의 증류수와 잎을 믹서에서 마쇄하여 3,000 ml 농축 플라스크에 넣고, heating mantle에 올린 후, sample이 담긴 곳의 온도는 약 70℃로 하였고, diethyl ether와 hexane이 각각 40 ml씩 (1/1, v/v)로 들어 있는 농축플라스크의 heating mantle의 온도는 30~40℃ (약 38℃)로 하여 2시간 동안 가열하였다. 한번 증류하는데 필요한 시료의 양은 250 g로 하였으며, 추출 후 추출물 속의 수분을 없애기 위해 무수황산나트륨 (Na_2SO_4)을 소량 넣은 다음 냉동고에 방치하였고, 이후 여지 (Toyo filter paper NO. 2)에 걸러 농축하였다.

2. 공시충

배추좀나방 (*Plutella xylostella*)과 담배거세미나방 (*Spodoptera litura*)을 실험곤충으로 이용하였으며, 이들은 살충제 도태를 하지 않은 실험실내 계통으로서 온도 27 ±

1°C, 상대습도 55 ± 5 %, 조광시간 16L : 8D의 조건으로 사육하였다. 쌀바구미와 팔바구미를 이용하였는데, 사육은 본 연구진에 의하여 개발된 방법에 준하였다 (Ahn 등, 1992).

3. 생물검정

1) 섭식저해활성

실험곤충에 대한 메탄올 조추출물의 섭식저해활성은 안과 조 (1992), 안등 (1992)의 방법에 따라, 본 실험에서는 5,000 ppm을 출발농도로 하여 잎침지법으로 생물검정을 행하였다.

Cork borer로 오려낸 양배추 (*Brassica aleracea*) 잎절편을 이용, choice test로 섭식저해활성을 조사하였다. 시료는 아세톤 또는 메탄올에 녹인 후, 계면활성제인 Triton X-100 100 ppm 수용액과 1:9 (v/v)의 비율로 하여 농도 5,000 ppm의 추출물 희석액을 만들었다. 이 용액에 잎절편 (담배거세미나방은 직경 2 cm; 배추좀나방은 직경 1 cm)을 10초간 침지하였으며, 대조구로서는 Triton X-100 100 ppm 수용액에만 잎절편을 10초간 침지하였다. 이들 시료는 hood에서 2 시간 풍건시켜 샬레에 옮겨, 담배거세미나방과 배추좀나방 2~3령 유충을 각각 10마리씩 샬레에 방사하고 나서 온도 27 ± 1°C, 상대습도 55 ± 5 %, 조광시간 16L : 8D의 실내에 방치한 다음, 처리 24시간 후 섭식정도를 조사하였다. 흰개미의 경우에는 여지확산법을 이용하여 공시시료 0.5mg/disk의 농도로 처리하였다.

각 시료의 섭식저해활성 (antifeeding activity)은 아래와 같은 식으로 산출하였다. C는 대조구의 섭식정도이며 완전히 섭식한 경우에는 100, 섭식하지 않은 경우에는 0으로 하였으며, T는 처리구의 섭식정도로서 마찬가지로 완전히 섭식한 경우는 100, 섭식하지 않은 경우 0으로 하여 저해활성정도를 산출하였다 (Isman 등, 1990). 저해활성이 100~80 % 일 경우 ++, 80~50 % 일 경우 +, 50 % 미만일 경우 - 로 평가하였다.

$$\text{Antifeeding activity (\%)} = (C-T)/(C+T) \times 100$$

2) 기피활성 검정

기피효과의 생물검정은 시료 5 mg을 아세톤 1ml에 녹여 여지(직경 2 cm)에 흡지시킨 후 Y 자관(직경 3 cm, 길이 30 cm, 분기점 15 cm)의 한쪽 끝에 넣고 다른 쪽에는 용매만을 처리하여 기피효과를 조사하였다. 활성검정은 화합물당 10개체의 기피행동을 조사하였고, 각 개체별 기피활성정도를 퍼센트로 환산하였다.

$$\text{기피활성 (\%)} = \frac{\text{처리구쪽 유리관 회피하거나 도망하는 행동에 보이는 개체수}}{\text{처리수}} \times 100$$

4. 섭취저해성분의 분리 및 정제

황련의 메탄올 추출물이 강한 섭취저해 활성을 보여 상기 식물체 메탄올 조추출물 20 g을 증류수 800 ml와 헥산 800 ml에 녹여 2 L 분액여두에 넣은 후, 마개를 닫고 시료와 두가지 용매가 잘 섞이도록 흔들어 물층과 헥산층으로 분리하였으며, 약 30분 후에 다른 분액여두를 이용해 헥산층은 뽑아내고, 물층에 새로운 헥산 800 ml를 부어 동일한 방법으로 2차의 헥산층을 뽑아내었다.

남아있는 물층에 클로로포름 800 ml를 붓고 마개를 닫은 후 충분히 흔들어 물층과 클로로포름층으로 분리하였으며, 약 30분 후에 클로로포름층을 뽑아내고, 물층에 새로운 클로로포름 800 ml를 부어 동일한 방법으로 2차의 클로로포름층을 뽑아내었다. 마지막 단계로서, 남아있는 물층에 에틸아세테이트 800 ml를 부어 헥산 분배시와 동일한 방법으로 에틸아세테이트층을 2회에 걸쳐 뽑아내었다.

이상과 같이 용매분획하여 헥산층, 클로로포름층, 에틸아세테이트층 및 물층의 4획분을 얻었으며, 이중 물층은 동결건조기(Vertis, USA)를 이용하여 진공감압하여 물을 제거하였으며, 헥산층, 클로로포름층, 에틸아세테이트층은 회전진공농축기(EYELA autojack NAJ-160, Japan)로 농축하였다.

생물검정 결과, 클로로포름층에서 가장 강한 활성을 보였기 때문에, 활성층 24g을 Silica gel open column chromatography로 분리하였다. 유리관 칼럼(PTEE end plate

부착)을 시료의 양에 따라 선택하여 사용하였으며 Silica gel 60 (70-230 mesh, Merck)의 양은 시료양의 50-60 배로 하였다. 클로로포름층의 전개용매(eluent system)는 methanol/chloroform gradient(1, 2.5, 5, 10, 100%)로 용출시켰다. 시료가 클로로포름이나 전개용매에 녹지않을 경우, 아세톤이나 메탄올에 녹여 소량의 silica gel로 직접 흡착시킨 후 크로마토그래피를 행하였다.

분취한 시료는 박층크로마토그래피(thin layer chromatography, TLC)에 의해 ethylacetate /hexane 또는 methanol/chloroform을 부피비로 섞어 전개시킨 다음, TLC plate (SIL G/UV₂₅₄, 0.25mm, Macherey-Nagel, Germany.)상에 전개된 band pattern을 UV hand lamp (UVGL-58, UV-254/366nm, UVP Inc.)로 확인하였으며, 동일 spot으로 확인되면 서로 합쳐 감압농축한 후 생물검정을 행하였다.

Silica gel open column chromatography를 행하여 얻은 활성층을 고속액체크로마토그래피로 분리, 정제하기 위해 UV spectrophotometer(HP 8452 A/diode array spectrophotometer, Hewlett Packard)를 이용하여 최대 흡수파장을 검색하였다(reference solvent: MeOH). 분취용 HPLC는 Waters Delta Prep 4000 system을 사용하였으며, 칼럼은 Bondapak C₁₈ prep. column (19 mm i.d. x 30 cm, Particle size 125 Å, Waters)을 이용하였으며, 용출용매로서는 MeOH/Acetonitrile/Water를 5ml/min의 조건으로 하였다. 이들 활성성분은 5.10분(compound A), 5.14분(compound B)의 retention time을 보이는 단일 peak의 화합물로 확인되었다.

이들 활성층 C4221과 C4222의 2개 획분을 각각 증류수에 녹여 1N HCl을 첨가하여 침전물 A를, 7.5% HI를 첨가하여 침전물 B를 얻었다(그림 2.1).

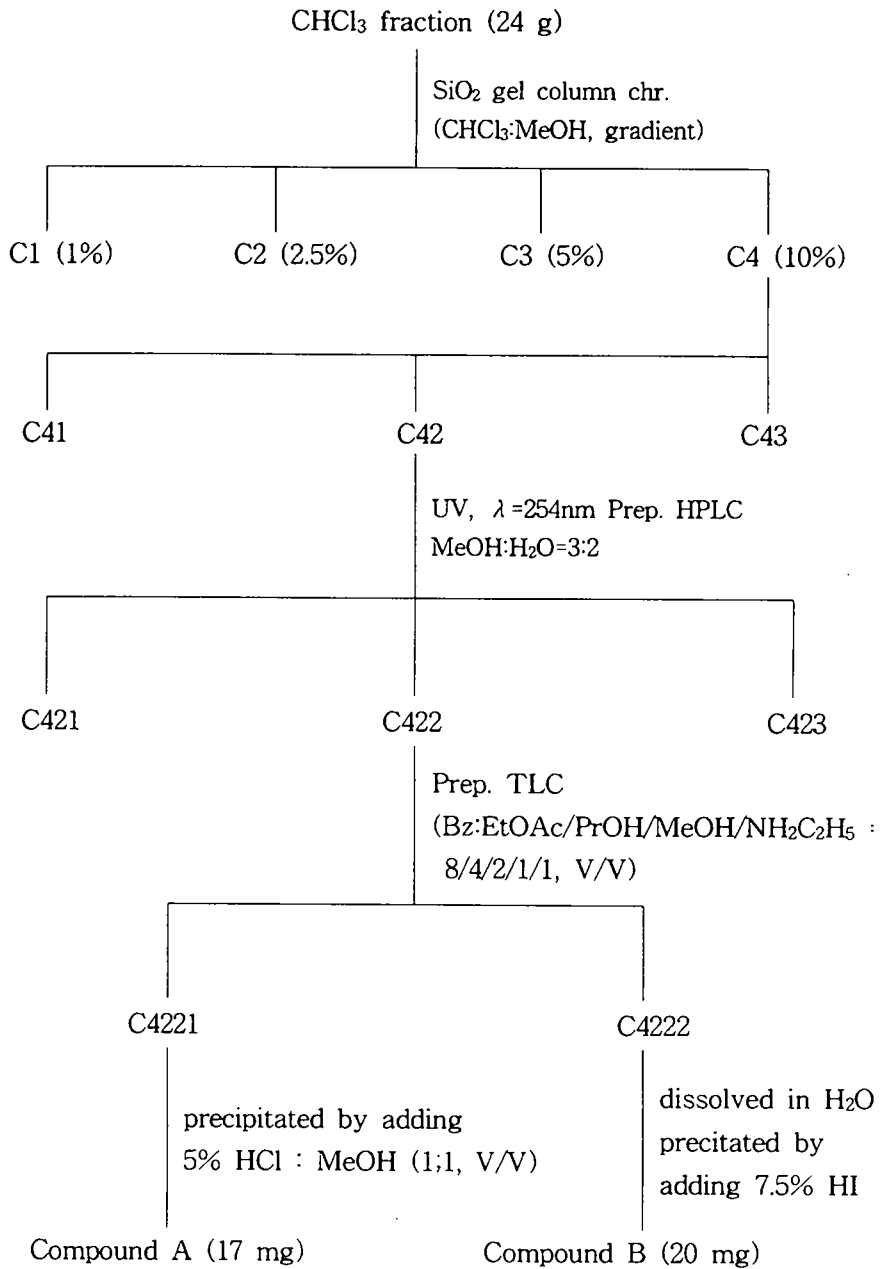


그림 2.1. 황련의 섭취저해활성 성분의 분리

Ⅲ. 결과

1. 섭식저해활성 스크리닝

식물체 48종의 배추좀나방과 담배거세미나방에 대한 섭식저해활성을 조사한 결과 (표 2.1), 황련, 정향, 유향, 백단향, 석창포, 오수유, 백부근, 천궁, 울금, 은행, 용뇌, 쑥, 계심, 촉초, 검은재나무, 곰의말채, 괴물나무, 굴피나무, 까치박달, 담팔수, 때죽나무, 말채나무, 무환자나무, 비자나무등에서 배추좀나방과 담배거세미나방 유충에 대하여 강한 섭식저해활성을 나타내었다.

표 2.1. 공시식물체의 배추좀나방과 담배거세미나방 유충에 대한 섭식저해활성

식물체	섭식저해활성		
	배추좀나방	담배거세미나방	
정향	<i>Eugenia aromatica</i>	+++	+++
유향	<i>Boswellia carterii</i>	+++	++
백단향	<i>Santalum album</i>	+++	+++
석창포	<i>Acorus gramineus</i>	++	++
오수유	<i>Evodia rutaecarpa</i>	+++	+++
백부근	<i>Stemona japonica</i>	+++	+++
천궁	<i>Ligusticum chuanxiong</i>	++	+++
울금	<i>Curcuma longa</i>	++	++
은행	<i>Ginkgo biloba</i>	++	++
용뇌	<i>Dryobalanops camphora</i>	++	++
쑥	<i>Artemisia vulgaris</i>	+++	++
계심	<i>Viola vaginata</i>	+++	++
촉초	<i>Zanthoxylum piperitum</i>	++	+++
검은재나무	<i>Symplocos pruinifolia</i>	+++	+++
곰의말채	<i>Cornus macpophylla</i>	+++	+++
괴물나무	<i>Lonicera maackii</i>	+++	+++
굴피나무	<i>Plathcarya strobilaceae</i>	++	++
까치박달	<i>Carpinus cordata</i>	+++	+++
담팔수	<i>Elaeocarpus sylvestris</i> var. <i>ellipticus</i>	+++	+++
때죽나무	<i>Stryax japonica</i>	+++	+++
말채나무	<i>Cornus walteri</i>	+++	++
무환자나무	<i>Sapindus mukorossi</i>	++	++
비자나무	<i>Torreya nucifera</i>	+++	+++
황련	<i>Coptis japonica</i>	+++	+++

2. 황련의 섭취저해 성분

최종 정제된 생육억제성분은 EI-MS (JEOL JMS-DX 303), ^1H (100 MHz)-NMR(JEOL GSX-400), UV spectroscopy (HP 8452 A/diode array spectrophotometer), IR spectroscopy(Shimadzu IR-460) 등의 spectral techniques를 이용하여 구조동정하였다.

Compound A를 TLC상에서 전개해본 결과 (Bz/EtOAc/PrOH/MeOH/ $\text{NH}_2\text{C}_2\text{H}_5=8/4/2/1/1$), Rf치는 0.65로 authentic sample인 berberine chloride (Sigma)와 같았다. 정제된 활성성분 compound A의 EI-MS(그림 2.2), UV(그림 2.3), IR spectra(그림 2.4)에서 분석 결과 분자량(371.8)을 가졌고 254 nm 근처에서 전형적인 흡수파장 이외에 348 nm 근처에서 흡수치가 나타나는 것으로 보아 conjugation의 구조임을 나타내고, 3100-3000 cm^{-1} 범위의 signal은 aromatic C-H stretch이며, 1260-1200 cm^{-1} 범위의 signal은 asymmetric C-O-C stretch를 나타내고, 1600 cm^{-1} 의 signal은 C=C ring stretch를 나타내며, 1340-1266 cm^{-1} 근처의 signal은 aromatic C=N ring을 나타낸다. ^1H -NMR(그림 2.5)을 이용하여 활성성분의 spectral data는 authentic sample인 berberine chloride (Sigma)의 spectral data와 일치하여 isoquinoline alkaloid계의 berberine chloride ($\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{NO}_4\text{Cl}$)로 최종 확인하였다(그림 2.6).

정제된 compound B의 EI-MS spectra(그림 2.7)에서 353의 peak는 chloride가 떨어진 fragment와 일치하였고 UV(그림 2.8) 및 IR spectra(그림 2.9)는 berberine chloride와 같은 양상을 보여 ^1H -NMR(그림 2.10)을 이용하여 활성성분의 spectral data가 authentic sample인 palmatine iodide (Kawaguchi 등, 1989)의 spectral data와 일치하여 isoquinoline alkaloid계의 palmatine iodide ($\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{NO}_4\text{I}$)로 확인되었다(그림 2.6).

-212-

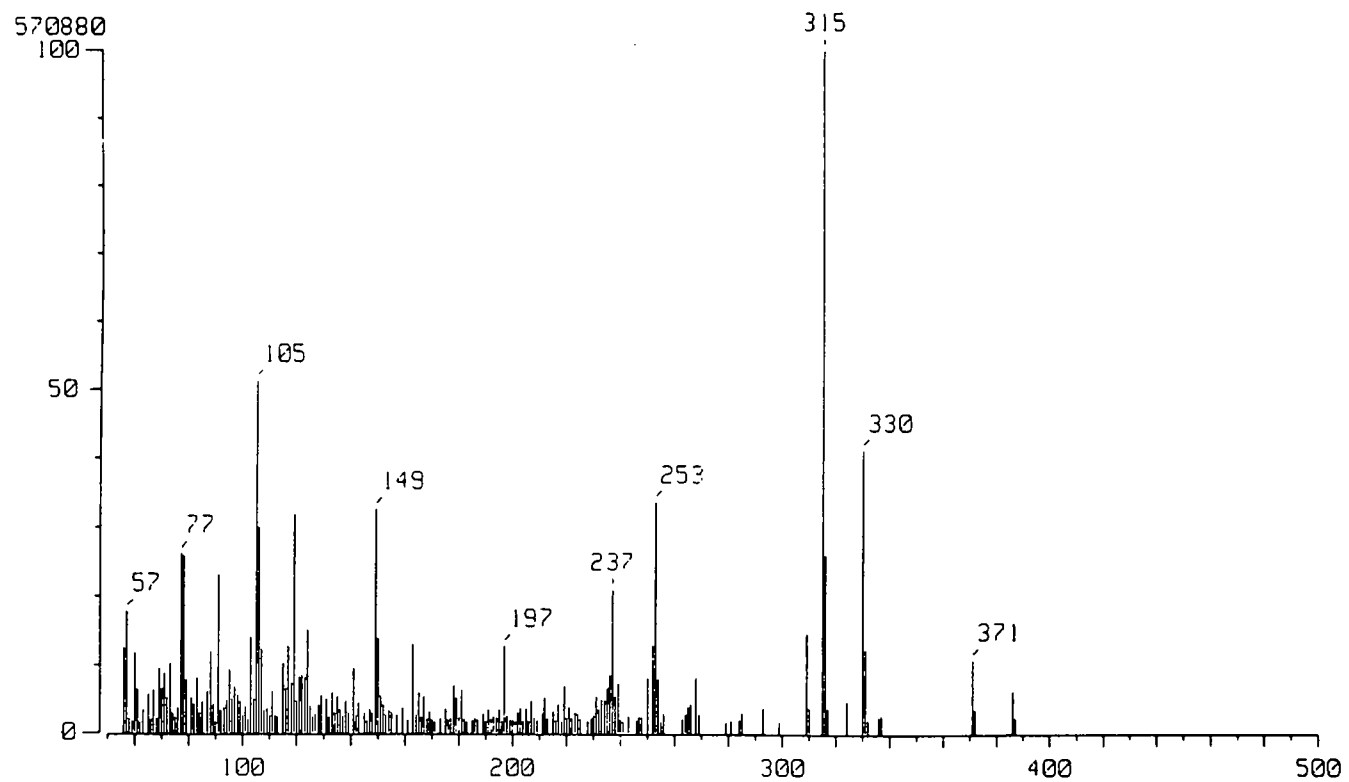


Figure 2.2. Mass spectrum of compound A

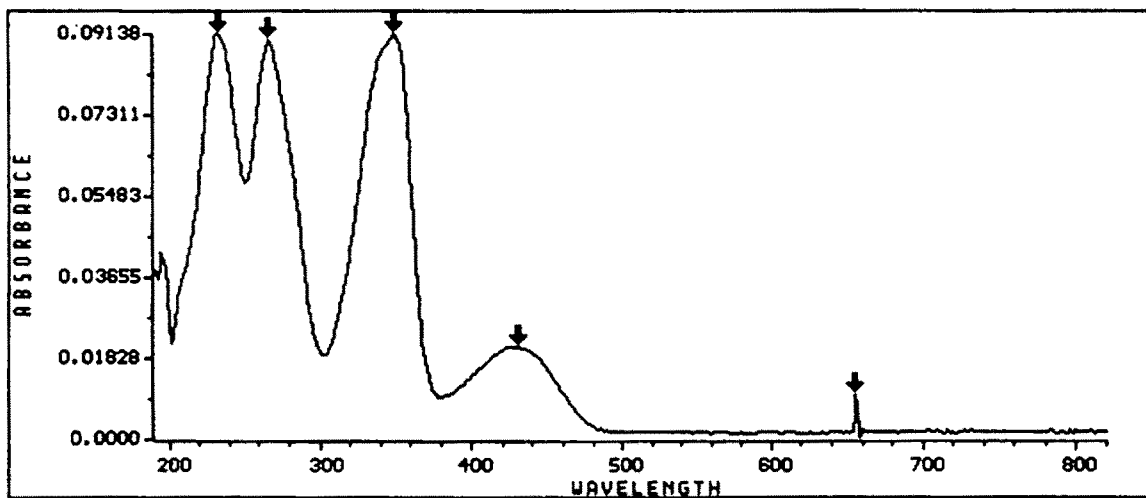


Figure 2.3. UV spectrum of compound A

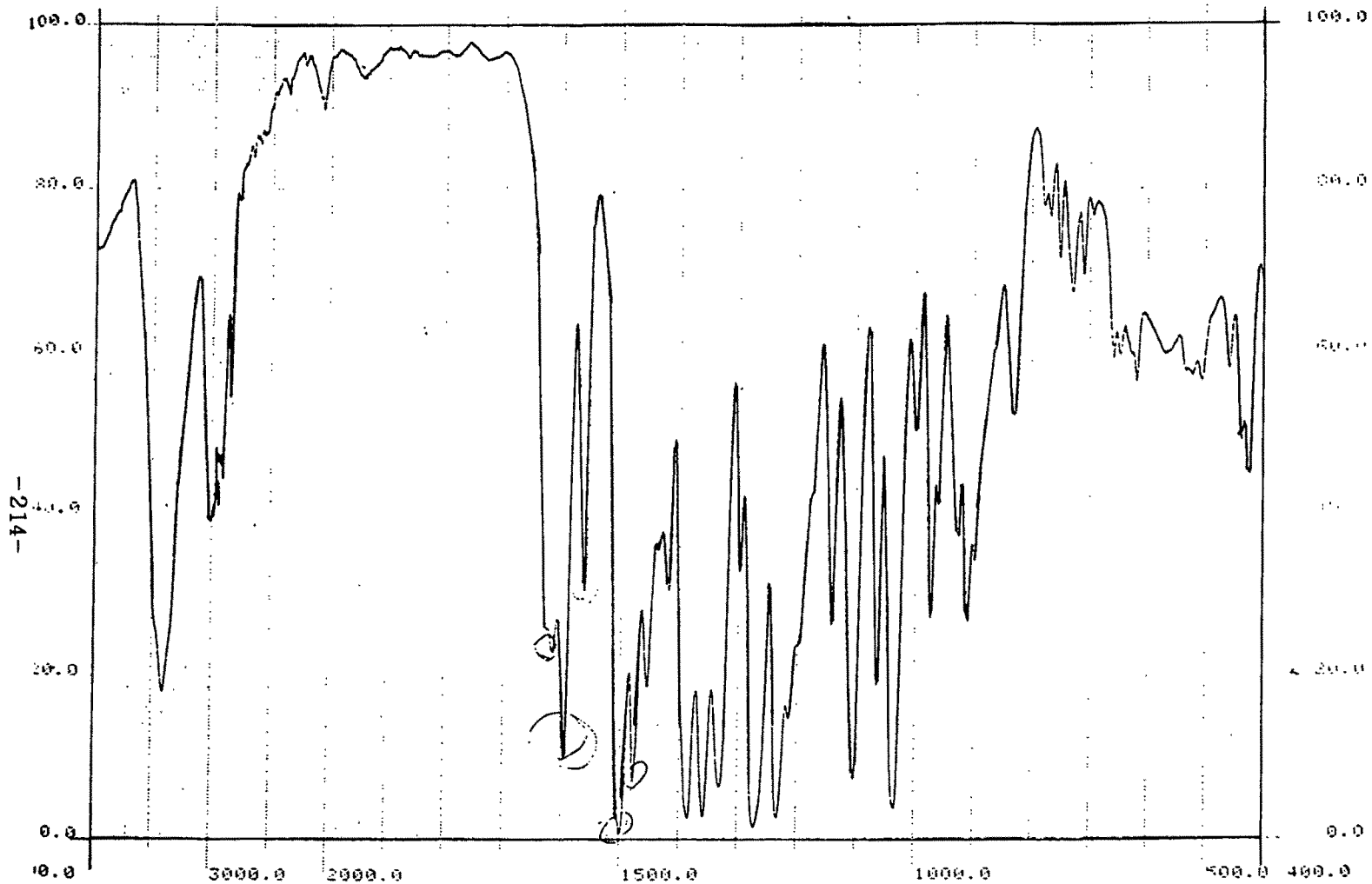


Figure 2.4. IR spectrum of compound A



Figure 2.5. ¹H-NMR spectrum of compound A

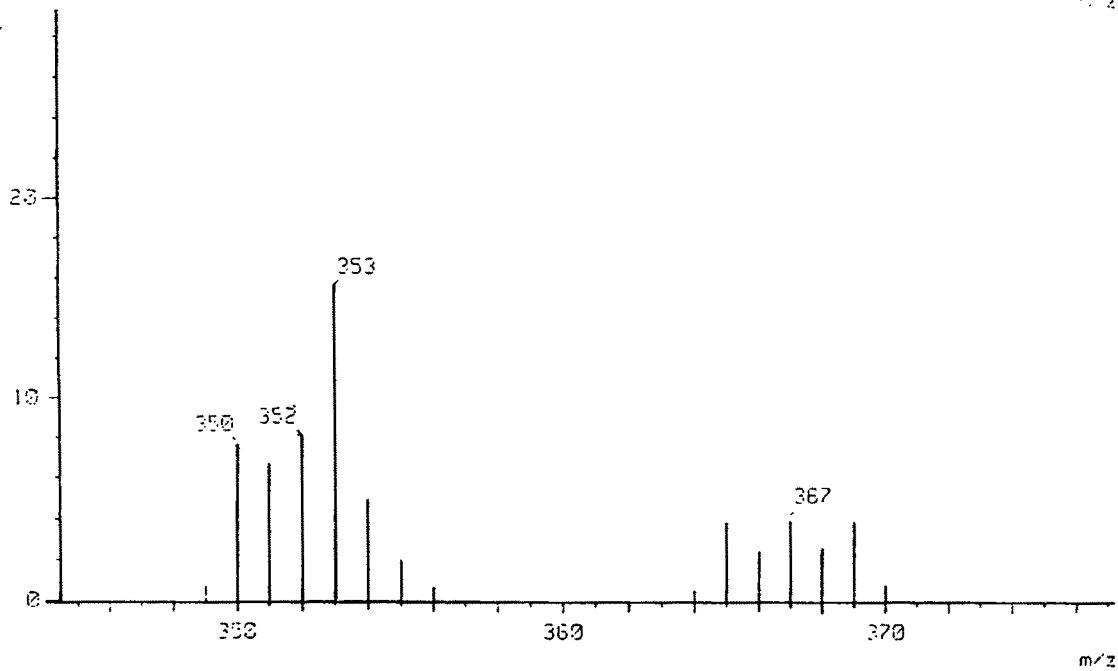
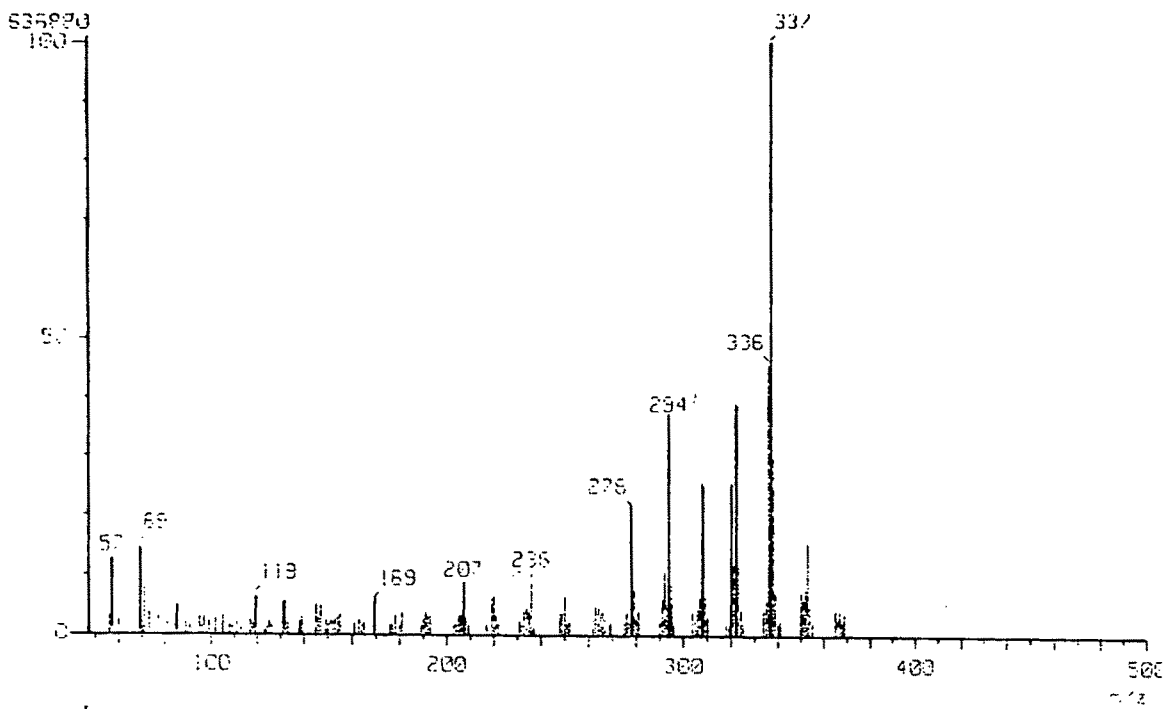


Figure 2.7. Mass spectrum of compound B

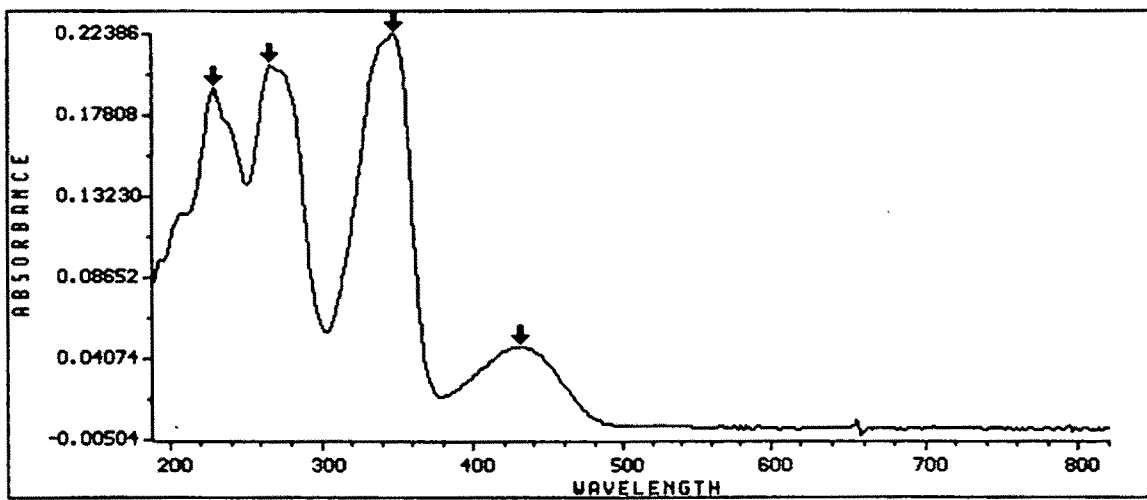


Figure 2.8. UV spectrum of compound B

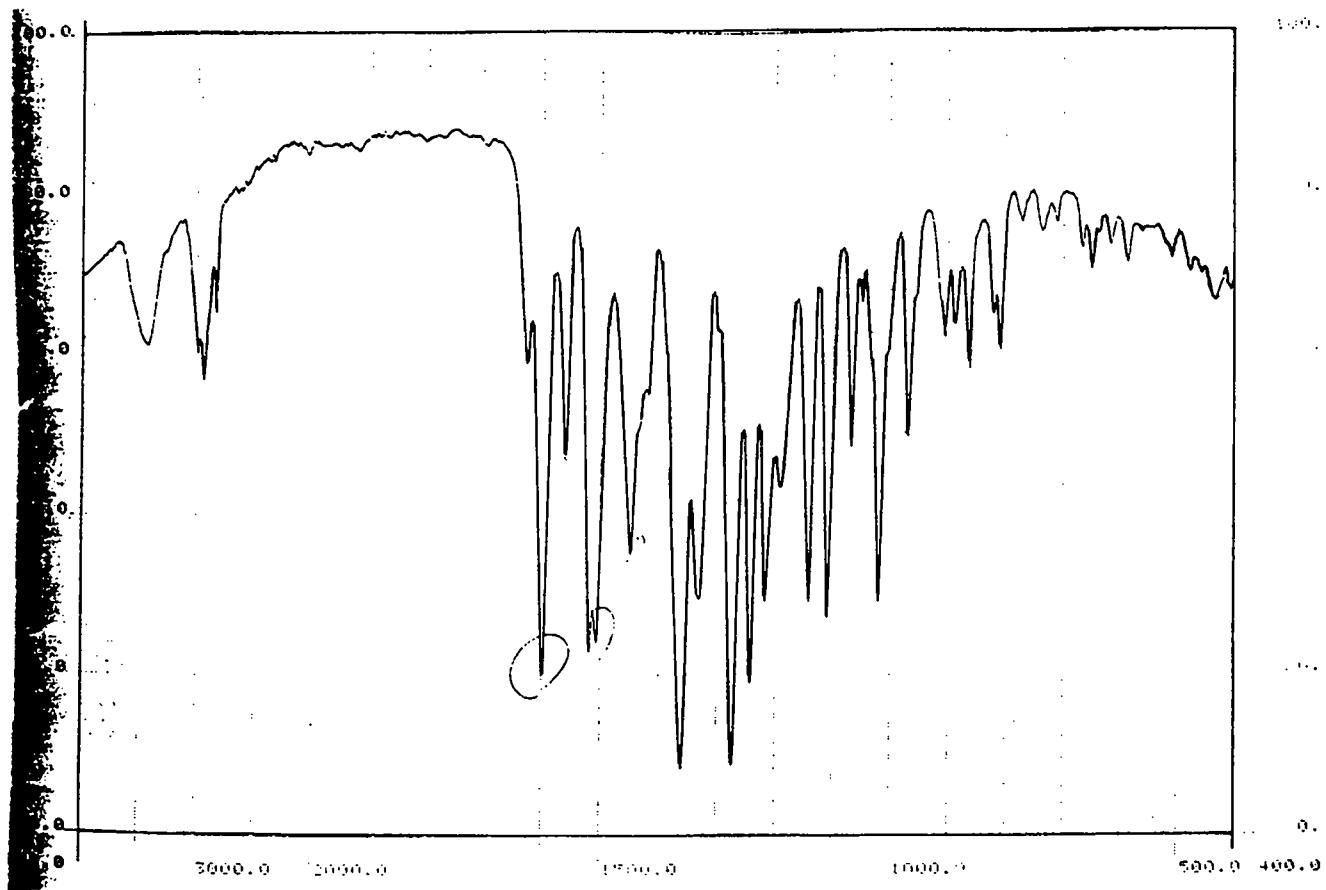


Figure 2.9. IR spectrum of compound B

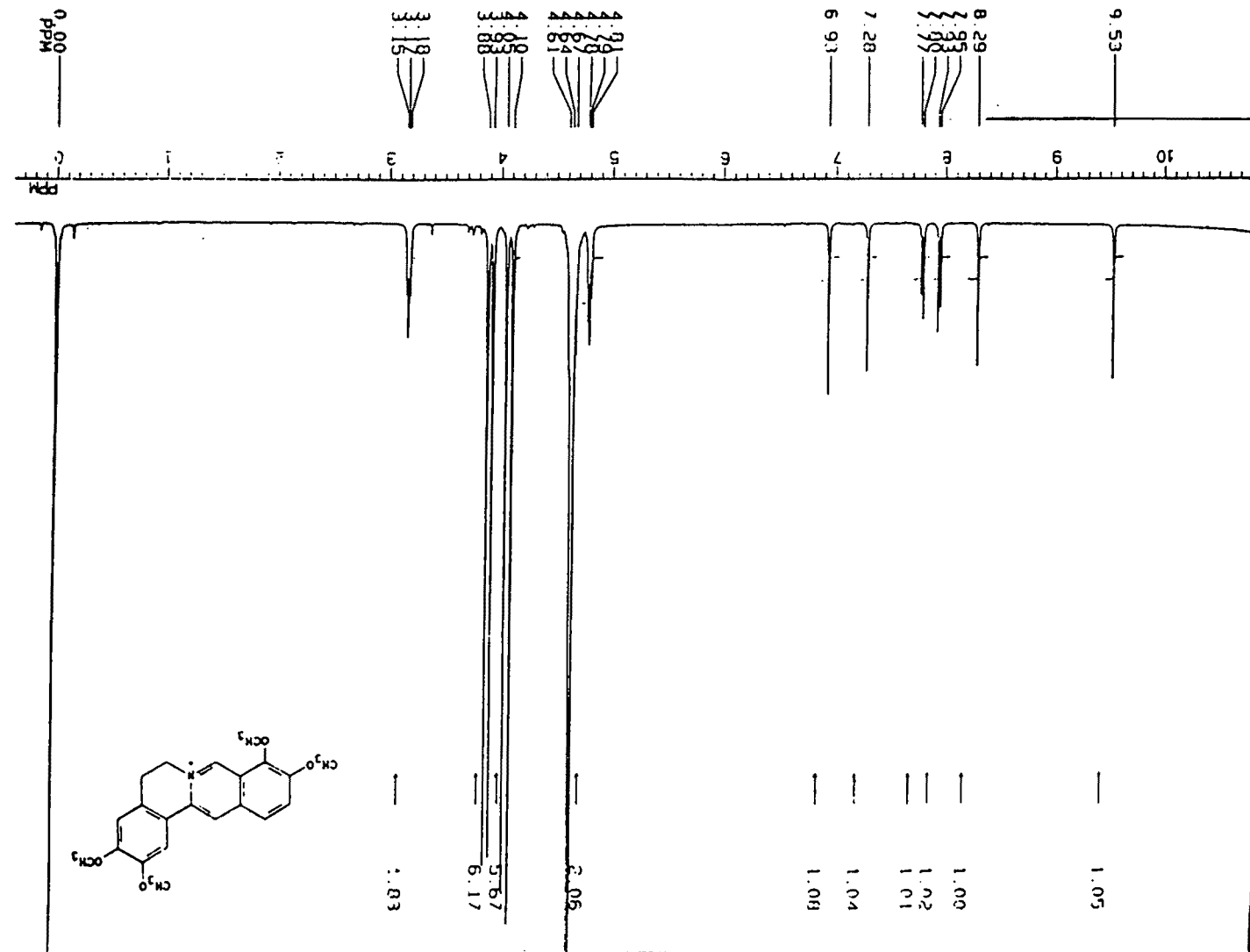
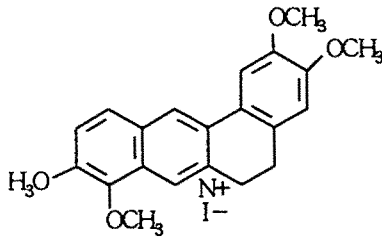
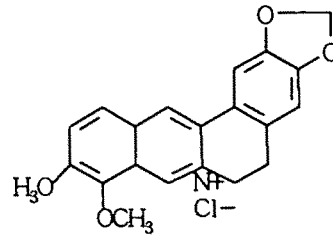


Figure 2.10. ¹H-NMR spectrum of compound B



Palmatine iodide



Berberine chloride

그림 2.6. Plamatine iodide와 berberine chloride의 구조

2. 황련의 섭취저해 성분의 활성

흰개미 및 배추좀나방 유충에 대한 황련유래 alkaloid인 berberine과 palmatine의 섭취저해활성을 조사한 결과(표 2.2), berberine은 0.5 mg, 0.25 mg에서 흰개미에 대해 강한 저해활성을 보였고, Palmatine의 경우 berberine에 비하여 약한 활성을 보였다. berberine은 배추좀나방유충에 대해서도 125 ppm 농도에서 강한 섭취저해활성을 보였으나, palmatine은 berberine에 비해 같은 농도에서 약한 활성을 보였다.

표 2.2. 황련의 흰개미 및 배추좀나방 유충에 대한 섭취저해활성

공시충	농도	섭식저해활성	
		Berberine	Palmatine
흰개미	0.5 mg	+++	++
	0.25 mg	+++	++
	0.125 mg	++	+
배추좀나방	500 ppm	+++	++
	250 ppm	+++	++
	125 ppm	+++	+
	62.5 ppm	++	+

3. 바구미에 대한 기피활성 스크리닝

21종 공시식물체의 쌀바구미(*Stophilus oryzae*)와 팥바구미(*Callosobruchus maculatus*)에 대한 기피활성을 조사한 결과(표 2.3) 목단피(모란의 뿌리 껍질)가 쌀바구미에 대해서 100%의 기피활성을 나타내었고 정향이 80%의 활성을 보였다. 21종 식물체 모두 팥바구미에 대해서는 어떤 활성도 나타내지 않았다.

표 2.3. 방향성 한방식물체의 바구미에 대한 기피활성

식물명	조직명 ^a	기피활성 ^b		
		쌀바구미	팥바구미	
후박	<i>Magnolia officinalis</i>	Co	-	-
정향	<i>Eugenia aromatica</i>	Ra	++	-
목단피	<i>Paeonia suffruticosa</i>	RC	+++	-
후추	<i>Piper nigrum</i>	Fr	-	-
대황	<i>Theum coreanum</i>	Fr	-	-
영릉향	<i>Lysimachia foenum-gaecum</i>	He	-	-
산목	<i>Clematis finetiana</i>	Fr	-	-
단목	<i>Nauclea officinalis</i>	Ra	-	-
오수유	<i>Evodia rutaecarpa</i>	Fr	-	-
촉초	<i>Zanthoxylum piperitum</i>	Fr	-	-
산초	<i>Zanthoxylum piperitum</i>	WP	-	-
마	<i>Dioscorea batatas</i>	WP	-	-
백부근	<i>Stemona japonica</i>	Ra	-	-
침향	<i>Aquillaria agallocha</i>	Li	-	-
백지	<i>Angelica dahurica</i>	Ra	-	-
천궁	<i>Ligusticum chuanxiong</i>	Ra	-	-
감송향	<i>Nardostachys chinensis</i>	Rh	-	-
계심	<i>Viola vaginata</i>	WP	-	-
울금	<i>Curcuma longa</i>	Rh	-	-
유향	<i>Boswellia carterii</i>	WP	-	-
은행	<i>Ginko biloba</i>	L	-	-

^a5,000ppm treatment.

^b+++ : >80%, ++ : 80-61%, + : 41-60%, - : <40%.

고찰

살충제의 연용과 남용은 많은 환경오염과 해충의 저항성 유발 등의 부작용을 야기하여, 인축 및 환경에 저독성인 새로운 형태의 해충제어물질의 개발이 시급한 실정에 있다. 새로운 농약을 개발하는 방법에는 크게 화학적 합성에 의한 방법과 천연물로부터 활성성분을 분리하여 직접 이용하거나 그것을 모핵으로 하여 새로운 농약을 개발하는 방법이 있으나, 화학적 합성에 의한 방법은 1/20,000 ~ 1/50,000 이라는 희박한 성공확률과 10 ~ 15 년이라는 오랜 개발 소요시간 및 막대한 비용의 투입 (永江, 1987)이라는 문제로 인해 선진국은 이미 식물, 동물 및 미생물과 같은 천연물로부터 개발하는 방법에 노력을 집중하고 있다. 특히 식물체가 함유한 농약활성성분의 탐색은 새로운 유형의 농약 개발에 있어서 중요한 의미를 가진다.

본 연구에서, 48종 식물체의 메탄올추출물을 주요 나비목 해충인 담배거세미나방과 배추좀나방 그리고 주요 저장물 해충인 쌀바구미와 팥바구미를 비롯해 주요 산림해충인 흰개미를 대상으로 생리활성을 탐색하여, 천연물유래 해충제어물질 (Bioregulator) 개발의 기초자료를 얻기 위해 실시하였다. 본 실험 결과, 배추좀나방과 담배거세미나방 유충에 대한 강한 섭식저해활성은 황련, 정향, 유향, 백단향, 석창포, 오수유, 백부근, 천궁, 울금, 쑥, 계심, 용뇌, 촉초, 은행, 검은재나무, 곰의말채, 괴물나무, 굴피나무, 까치박달, 담팔수, 매죽나무, 말채나무, 무환자나무, 비자나무 등에서 관찰되었는데, 특히 황련에서 분리한 berberine은 0.5 mg, 0.25 mg에서 흰개미에 대해 강한 섭식저해활성을 보였으며, Palmatine의 경우 berberine에 비하여 약한 활성을 보였다. 또한 berberine은 배추좀나방 유충에 대해서도 125 ppm 농도에서 강한 섭식저해활성을 보였으나, palmatine은 berberine에 비해 같은 농도에서 약한 활성을 보였다. 21종 식물체의 쌀바구미와 팥바구미에 대한 기피활성을 조사한 결과 목단피(모란의 뿌리 껍질)가 쌀바구미에 대해서 100%의 기피활성을 나타내었고 정향이 80%의 활성을 보였으나, 팥바구미에 대해서는 21종 식물체 모두 어떤 활성도 나타내지 않았다.

Jacobson (1988)은 식물의 해충에 대한 활성물질을 체계화하였는데, neem tree

(*Azadirachta indica*)가 속해 있는 멀구슬나무과, limonoids를 많이 함유하고 있는 운향과, 국화과, 아욱과 및 쓴 맛을 내는 성분이 많이 보고되고 있는 꿀풀과등의 식물이 식물성 해충제어제의 출처로서 유망하다고 하였다. 본 실험에서도 여러가지 식물을 담배 거세미나방과 배추좀나방에 생물검정한 결과, 국화과, 산형과, 마편초과 및 현호색과의 식물에서 높은 섭식저해활성을 나타내었다. 국화과에 속하는 식물은 sesquiterpene lactones 화합물이 많이 보고되어 있으며, 이들 화합물에 속하는 polygodial, warburganal, muzigadial등의 sesquiterpenoids는 *Pieris brassicae*의 5령 유충에 대하여 화학감각수용기에 영향을 주어 섭식을 저해하는 것으로 밝혀졌다 (Schoonhoven등, 1989). 본 실험에서의 국화과의 활성 역시 이러한 화합물에 의해서 섭식저해 작용을 나타내는 것으로 추측된다. 또한, 산형과의 식물은 세계적으로 약 3,000종이 보고되어 있는데 (Lawrence, 1970), 이차대사산물로서 페놀화합물인 coumarin류의 화합물이 많이 함유되어 있으며 (Berenbaum, 1983), 이 과에 속하는 실험 식물체에서도 이들 성분들이 섭식저해에 주요한 요인으로 작용하고 있는 것으로 추측된다.

본 연구에서, 강한 섭식저해작용을 나타내는 황련은 매자나무과에 속하는 한방식물로서, 염증치료, 진정제, 건위제 등에 이용되는데 잎과 뿌리에 알칼로이드와 사포닌이 존재하는 것으로 알려져 있다.

섭식저해물질로서 알칼로이드, 테르펜화합물 및 페놀화합물 등이 알려져 있는데, 본 연구의 실험 식물체인 황련으로부터 berberine, palmatine 및 여러 미동정 물질이 분리되었다. 본 실험에서 berberine은 흰개미 및 배추좀나방 유충에 대해 강한 섭식저해활성을 보였다. 화합물의 섭식저해작용 메카니즘에 관해서는 별로 연구되고 있지 않은 상태이나, Mitchell등 (1984)은 쓴 맛을 내는 대표적인 알칼로이드인 spateine, nicotine, quinine을 *Entomoscelis americana* 성충의 galeal sensillia에 대해 전기생리학적으로 실험한 결과 미각세포 억제에 의한 작용임을 밝혔으며, polygodial, warburganal, muzigadial등의 sesquiterpenoids는 *Pieris brassicae*의 5령 유충에 대하여 화학감각수용기에 영향을 주어 섭식을 저해하는 것으로 알려졌다 (Schoonhoven등, 1989). 본 연구

에 밝혀진 berberine의 경우 아직 섭식저해 작용메카니즘에 대해서 알려진 바 없다.

식물에 존재하는 기피물질은 탄화수소, 알코올, 알데히드, 에스테르, 정유, 질소화합물등 200여 종류의 휘발성 물질이 보고되어 있는데 (平野, 1971), 이들은 식물과 식물 (alleopathic interaction) 및 여러 주위 생물들과 복잡, 다양한 상호관계를 가지고 있다. 식물성분 중의 대표적인 휘발성분인 monoterpenoids에서 곤충에 대한 기피활성의 예는 기주식물과 주위의 가해곤충에 대해서 많이 연구되었는데, 이들 화합물은 세포독성을 가지고 있어서, 골지체와 미토콘드리아의 수 및 세포막의 투과성을 감소시킨다 (Harborne등, 1991). 본 연구에서의 기피활성을 나타내는 식물체들의 기피활성 메카니즘에 대해서는 알려진 바 없으나, 上記의 작용에 의한 것으로 생각된다.

향후, 우리나라의 한방식물체인 황련에서 분리한 활성 물질의 정확한 섭식저해의 메카니즘의 구명에 대한 연구가 진행되어야 할 것이며, 또한 생리활성물질의 보고라고 할 수 있는 한방식물체로부터 해충에 활성을 가지는 유망한 물질을 분리하여, 직접 해충방제에 이용하거나, 모핵화합물로서 새로운 유형의 해충제어물질을 개발하여야 할 것이고 저장물해충 방제를 위한 보다 안전하고 무해한 식물성유래 기피활성물질을 분리하여 기피제를 개발하여야 할 것이다.

IV. 인용문헌

안용준, 조광연. 1992. 살충제 개발을 위한 생물검정법의 확립. I. 각종 유기용매가 곤충의 독성과 약해 및 화합물의 용해성에 미치는 영향. 한국응용곤충학회지 31: 182-189.

안용준, 김길하, 박노중, 조광연. 1992. 살충제 개발을 위한 생물검정법의 확립. II. 처리 방법 및 종간에 따른 살충제 감수성 차이. 한국응용곤충학회지 31: 452-460.

Bentley, M. D., D. E. Leonard, W. F. Stoddard and L. H. Zalkow. 1984. Pyrrolizidine alkaloids as larval feeding deterrents for spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Agric. Food Chem.* 35: 467-471.

Burn, A. J., T. H. Coaker, P. C. Jepson. 1987. Integrated pest management. pp. 113-130.

永江祐治. 1987. 農業問題と農業開発指標. pp. 172-217. 新農薬開発と市場展望. CMC 株式会社(編), 東京.

Elliot, M. 1976. Synthetic pyrethroids, pp.1-28. *In Synthetic Pyrethroids.* ed. by M. Elliot. ACS Symp. Ser. 42, Am. Chem. Soc., Washington, D. C..

Harborne, J. B. 1993. Introduction to Ecological Biochemistry. 4rd Ed. Academic Press, London.

Isman, M. B. O. Koul, A. Luczynski and J. Kaminski. 1990. Insecticidal and antifeedant bioactivities of neem oils and their relationship to azadirachtin Content. *J. Agric. Food Chem.* 38: 1406-1411.

Jacobson, M. 1989. Botanical pesticides: past, present, and future, pp. 1-10. *In insecticides of Plant Origin*, eds. by J. T. Arnason, B. J. R. Philogene and P. Morand. ACS Symp. Ser. No. 387, Am. Chem. Soc., Washington, D. C.

Kang, S. K. 1992. Strategy for the development of microbial insecticides. Proc. '92 Agric. BioTech. Symp. on New Bio-Pesticides, pp. 137-171.

Kawaguchi, H., M. Kim, M. Ishida, Y. J. Ahn, T. Yamamoto, R. Yamaoka, M. Kozuka, K. Goto and S. Takahasi. 1989. Several antifeedants from *Phellodendron amurense* against *Reticulitermes speratus*. Agric. Biol. Chem. 53(10): 2635-2640.

Kuhr, R. J. and H. W. Dorough. 1976. Carbamate Insecticides: Chemistry, Biochemistry and Toxicology. CRC Press, Cleveland.

Lawrence, G. H. M. 1970. Taxonomy of Vascular Plants. MacMillan, New York.

Ley, S. V. 1990. Synthesis of antifeedants for insect: novel behaviour-modifying chemicals from plants, pp 80-98. *In* Bioactive Compounds from Plants. Ciba Foundation Symp. 154, A Wiley-Interscience Publication.

Metcalf, R. L. and R. B. March. 1950. Properties of acetylcholine esterases from the bee, the fly and the mouse and their relation to insecticide action. J. Econ. Entomol. 43: 670-677.

Mitchell, B. K. and J. F. Sutcliffe. 1984. Sensory inhibition as a mechanism of feeding deterrence: effect of three alkaloids on leaf beetle feeding. Physiol. Entomol. 9: 57-64.

Miyakado, M. 1986. The search for new insecticidal and fungicidal compounds from

plants. *J. Pesticide Sci.* 11: 483-492 (In Japanese with English summary).

Nordlund, D. A., R. A. Jones and W. J. Lewis. 1981. *Semiochemicals; Their role in pest control*, pp. 3-24. A Wiley-Interscience Publication.

Schoonhoven, L. M. 1982. Biological aspects of antifeedants. *Entomol. Exp. Appl.* 31: 57-69.

Schoonhoven, L. M. and Y. Fu-Shun. 1989. Interference with normal chemoreceptor activity by some sesquiterpenoid antifeedants in an herbivorous insect *Pieris Brassicae*. *J. Insect Physiol.* 35(9): 725-728.

Smith, C. M. 1989. *Plant Resistance to Insects; A Fundamental Approach*, pp. 34-42.

제 3 절 생쥐에 대한 기피활성

I. 서 언

포유동물강(Mammalia)에 속하는 설치류(Rodentia)는 전 세계적으로 1,800 종이 분포하고 있으며 우리나라의 경우 쥐과 (Muridae)와 다람쥐과(Sciuridae)가 있고 그 속에 9 屬, 15 種이 기록되어 있다. 설치류의 곡물에 대한 피해는 이미 기원전 3000년 경의 인도의 기록에서 부터 찾아볼 수 있으며, 암수 한쌍에서 1년이 지나면 900마리 정도가 생기는 놀라운 번식력과 뛰어난 적응력(이, 1994)으로 인류에게 끝없이 식량 자원에 대한 위협적 존재가 되어 왔다.

설치류에 의한 경제적 피해 특히 농작물과 저장 곡물에 대한 피해는 연간 3천만 톤에 이르며 이를 위해 소비되는 살서제만도 연간 약 5톤에 이른다. 중세 유럽에서 쥐에 의한 페스트 만연이 문제가 되었듯이 현재에도 흑사병(plague), 살모넬라증(salmonellosis), 서교열(rat-bite fever), 유행성출혈열(epidemic hemorrhagic fever), 리슈마니아증(leishmaniasis), 렙토스피라증(leptospirosis)과 같은 여러 질병 병원체의 병원소가 됨으로써 위생적 측면에서도 문제가 되고 있는데, WHO에 따르면 약 40여종의 병원균을 옮겨 주는 것으로 알려져 있다(Gratz, 1988). 1990년대 말 현재 인도에서는 페스트가 엄습하여 많은 사상자가 발생하였으며, 이 병의 확산방지를 위해 쥐 퇴치 운동을 벌이고도 있다.

그러나, 그 어떤 문제점보다도 그들의 갉는 습성(gnawing)에 따른 피해정도는 심각하다 할 수 있다. "Rodents"라는 이름은 "Gnaw" 즉 갉는행동을 의미하는데 일년이면 14 cm까지 자라나는 위턱의 문치(incisors)는 먹이 섭취시 장애요인으로 작용, 이들의 생존에 직접적인 위협이 되므로 생후 2주 후부터 죽을 때까지 자라는 양만큼 마멸시켜야 한다. 따라서 나무나, 옷감, 아연관, 콘크리트, 알루미늄 등 보이는대로 갉는 습성이 있는데 건축구조물, 댐 뿐아니라 무엇보다 정보화 시대의 골격이라 할 수 있는 전선, 케이블 등의 통신시설에 대한 피해는 다가오는 21세기엔 커다란 위협이 될 것으로 예

측되고 있다. 실제 일본에선 지진을 대비해 건물마다 마련해놓은 공간 포켓(pocket)이 오히려 쥐들에겐 서식, 은둔하기 좋은 장소가 되어 전선에 대한 피해가 급증하고 있는데 전력통제선의 절단으로 건물 전체가 마비되는 경우도 있다(조선일보, 1994). 일본 뿐만 아니라 세계적으로 원인을 알 수 없는 누전으로 인한 화재는 거의 쥐들에 의한 것으로 추정되고 있다. 또한 국내의 울산과 같은 공단 지역의 경우 합선으로 전력공급이 끊겨, 굳어버린 액체연료로 인한 피해가 수십 억에 이르며 대단위 공장의 경우 변전실의 피해로 전체 생산 라인가동이 중단되는 경우도 있다(조선일보, 1996).

따라서 인류는 오래전부터 쥐덫과 같은 물리적 방법과 ANTU(α -naphthylthiourea), sodium fluoroacetate, fluoroacetamide, thallium sulfate 등의 무기화합물이나 유기화합물을 이용하여 방제하여 왔으나 이들의 급성 독성작용(acute toxicity)으로 인해 일단 섭식후 죽은쥐를 본 다른 쥐는 다시는 접근을 않거나 아치사량(sublethal dose) 만을 섭취한 쥐가 일생을 통해 기피하게 되는 독먹이 기피증상(bait shyness)으로 인한 방제 효과 감소 및 개나 고양이, 가축이 살서제에 중독된 쥐를 섭식함으로 야기되는 2차 중독의 문제점을 지니고 있다. 또한 이러한 단점을 보완하기 위한 항응혈성살서제(anticoagulant rodenticide)인 쿠마린 유도체 계열의 warfarin과 fumarin 같은 만성독제(chronic poisons)도 있으나 생리적 저항성(physiological resistance)이 발현되는 등의 문제가 있어 다른 차원의 방제책이 요구되어 왔다. 현재 국내에서는 warfarin 정도만이 다른 물리적 방법과 함께 사용되고 있다.

최근 들어 번식억제 물질로 생존율을 제한하거나 기피제를 이용하여 서식지 변경을 통해 그 밀도를 조절하는 "nonlethal rodenticides"라는 새로운 개념의 방제책이 시행되고 있는데 여러 방면에서 그 활용이 요구되고 있음에도 불구하고 현재 개발되어 있는 것은 극소수이다. 일본의 경우 고추의 매운성분을 주원료로 한 새로운 쥐 구축제 'R-731'을 전선의 피복재에 처리, 쥐의 접근을 막는데 이용하고 있으며 피복재 외에도 도료에 처리하여 쥐의 피해를 막거나, 다른 동물의 구축에도 사용할 수 있는 방안을 연구중에 있다(조선일보, 1994).

대개 기피제의 활용은 세가지 측면, 즉 작물과 종자보호, 포장물에 대한 보호, 구조물 방지 차원에서 생각할 수 있는데, 무엇보다 먼저 그 활용은 작물과 종자 보호 차원에서 이루어졌다. Methiocarb, thiram, endrin 등이 대표적 기피제로 이중 thiram은 조류 기피제로도 사용되고 있으나 이들이 설사 강력한 작물과 종자에 대한 보호제라 하더라도 경우에 의해 소실되는 점을 보완해야 한다는 문제점을 안고 있다(Koehler et al., 1983).

한편 종래의 합성살서제와 달리 천연물 유래물질은 보다 안전하고 생태계에 친화성(ecofriendly)을 지니고 있으며 저항성(Rice, 1993), 환경오염(Johri et al., 1993) 등의 문제가 없어 현재 그 연구가 활발히 진행되고 있는데 기존의 천연물 유래 기피제로는 미생물유래의 cycloheximide(Traub, 1950), 나한백과 같은 식물체 유래의 cavacrol(Ahn et al., 1995) 등이 있다. 이 외에도 많은 가능성 있는 기피제가 제시되고는 있지만 실제 상업화 되어 실용화 되고 있는 것은 극소수이며 또한 있다 하더라도 기피제라기보단 살서제로 작용하는 경우가 더 많은 점, 또한 캡사이신이나 denatonium saccharide, denatonium benzoate의 경우, 모든 포유류에 자극적이며(Meehan, 1988) 그 효과 면에서도 종간 및 종내 변이성을 지니고 있다는 문제점도 지니고 있는 등의 단점 또한 지니고 있다. 항생물질인 cycloheximide나 훈증제인 chloropicrin 같은 경우는 너무나 독성이 강하고 R55 같은 경우 인간과 가축에게 너무나 불쾌감을 준다. 기피제에 관한 연구는 과거 50-60년대의 활발한 연구에 비해 근자에 이르러선 줄어들고 있는 실정이라 할 수 있다.

이에 환경오염을 야기할 수 있는 종래의 lethal rodenticide의 사용량을 감소시킴과 아울러 인축 및 환경에 부작용을 최소한으로 줄일 수 있는, nonlethal rodenticide로서의 개발을 위하여 방향성 적송외 37종에 대한 감기억제활성을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 동물

실험동물로서 S1c : 삼육농장으로부터 구입한 ICR계통의 생쥐(4주 생의 암컷, 체중 24 g)를 이용, 실험에 들어가기 전에 1주간 실험실에서 순화시켰으며, 실험은 6주된 생쥐를 이용하였다. 고형사료 (삼육 동물제품: 조단백질 > 19.6%, 조섬유 < 7.0%, 조회분 < 9.0%, Ca < 0.6%, P < 0.4%, DCP > 16.5%, TND > 7.3%, 항생물질 < 50 ppm)로, 온도 $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 상대습도 60%, 명암(12:12)의 조건하에서 사육하였으며, 물은 필요에 따라 공급하였다.

2. 생물검정

검정은 본 연구진(안동, 1992)에 의하여 개발된 전선침지법(wire-dipping method)으로 조사하였는데 전선을 5 cm 간격으로 절단한 후, 각 식물체의 5% 에탄올 용액에 3분간 침지시킨후 꺼내어 후드내에서 건조시키고 나서 사육 케이지내에 생쥐와 각 시료 처리된 전선을 함께 넣어주고 나서 3일후 생쥐에 의하여 피해를 받은 총 길이[AVL = (the length gnawed in each wire segment treated with test material/the length gnawed in each wire segment treated with ethanol) x 100] 및 갇힌 흔적수[AVS = (the number of scars in each wire segment treated with test material/the number of scars in each wire segment treated with ethanol) x 100]를 조사하였다.

기피활성은 AVS 및 AVL 값이 <10% 이면 +++, AVS 및 AVL 값이 10-30% 이면 ++, AVS 및 AVL 값이 31-50% 이면 +, AVS 및 AVL 값이 >50% 이면 -로 나타내었다.

3. 공시식물체 및 시료 조제

적송의 37종의 방향성 식물체를 anecdotal한 방법 또는 문헌을 통하여 선발하였고(Namba 1986, 문 1991), 소나무과(Pinaceae)의 적송(*Pinus densiflora*)은 10 ~ 11월에 서울대학교 농업생명과학대학 교정에서 채집하여 생엽을 이용하였으며 방향성 식물체는 경동시장(서울)에서 구입하여 열풍건조기에서 2일간 건조시켰다.

적송을 제외한 기타 식물체는 믹서로 마쇄한 후 500 ml Erlenmeyer flask에 넣고 식물체 100 g당 메탄올 300 ml를 부어 실온 암실하에 방치하였다. 소나무의 경우, 생엽을 메탄올을 부어 믹서로 마쇄하였다. 3 일후 감압여과 하고 나서 진공 회전 농축기 (EYELA autojack NAJ-100, Japan)로 40℃ 에서 감압 농축하여 메탄올 조추출물을 얻은 후 이를 이용 실험 대상인 생쥐를 이용하여 갑기 억제 활성을 검정하였다. 각 식물체의 증명 및 과명, 수율을 표 3.1에 나타내었다.

4. 갑기억제성분의 분리 및 정제

공시 식물체인 38종 식물체 중에서 적송 및 계심의 갑기억제 활성이 높았기 때문에 이를 이용하여 갑기 억제 성분의 분리 및 동정을 행하였다. 적송 및 계심 메탄올 조추출물 20 g을 증류수 800 ml에 녹여 2 L 분액 여두에 넣은 후 헥산, 클로로포름, 에틸 아세테이트 각각 800 ml를 붓고, 시료와 두가지 용매가 잘 섞이도록 흔들어 순차분획하고 각 분획층을 농축하여 생물검정용 시료 및 활성물질 정제에 사용하였다.

Silica gel open column chromatography에 의해 분리된 획분은 고속액체크로마토그래피(HPLC)를 행하여 생물검정을 병행하면서 순차적으로 분리정제하였다.

적송의 생쥐에 대한 갑기 억제 활성 본체는 EI-MS (70 ev, JEOL JMS-DX 303), ^1H (400 MHz) 및 ^{13}C (100 MHz) NMR (JEOL GSX-400, TMS as an internal standard), FT-IR (Shimadzu IR-460)등의 spectral techniques를 이용하여 구조 결정하였다.

5. 돌연변이원성 검정

시험균주는 한국화학연구소 안전성연구센터의 *Salmonella typhimurium* TA-1535, TA-1537, TA-98 및 TA-100을 이용하였으며, 제 1 장에서 언급한 바와 같이 Maron과 Ames(1983)의 방법에 따라 정제 화합물의 돌연변이원성을 검정하였다.

Cinnamaldehyde를 DMSO에 용해하여 5 mg/ml 액을 만들고 이를 단계희석하여 각 농도의 원액을 조제하였다. 음성대조물질로는 bilobalide의 희석에 사용한 DMSO

표 3.1. 생취 기피성 시험에 공시된 식물체

	Plant species		Family	Tissue sampled (Yield,%)
석창포	<i>Acorus gramineus</i>	천남성과	Araceae	WP (10)
쑥	<i>Artemisia vulgaris</i>	국화과	Asteraceae	R (7)
유향	<i>Boswellia carterii</i>	국화과	Asteraceae	S (11)
목향	<i>Aucklandia lappa</i>	국화과	Asteraceae	P (31)
용뇌	<i>Dryobalanops camphora</i>	용뇌향과		
향모	<i>Hierochloe odorata</i>	벼과	Gramineae	WP (7)
곽향	<i>Agastach erugosa</i>	팔풀과	Labiatae	WP (9)
형계	<i>Schizonepeta tenuifolia</i>	팔풀과	Labiatae	WP (8)
녹나무	<i>Cinnamomum camphora</i>	녹나무과	Lauraceae	L (15)
육계	<i>Cinnamomum cassia</i>	녹나무과	Lauraceae	P (5)
조협	<i>Gleditsia horrida</i>	콩과	Favaceae	R (17)
감초	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	콩과	Favaceae	P (21)
	<i>Pterocarpus santalinus</i>			
대회향	<i>Illicium verum</i>	목련과	Magnoliaeaceae	WP (5)
후박	<i>Magnolia officinalis</i>	목련과	Magnoliaeaceae	WP (6)
정향	<i>Eugenia aromatica</i>	정향과	Myrtaceae	R (38)
목단피	<i>Paeonia suffruticosa</i>	미나리아재비과	Ranunculaceae	R (16)
적송	<i>Pinus densiflora</i>	소나무과	Pinaceae	WP (20)
후추	<i>Piper nigrum</i>	국화과	Compositae	WP (10)
	<i>Rheum officinale</i>			
영릉향	<i>Lysimachia foenum -graecum</i>	봄맞이과	Primulaceae	S (9)
으마리	<i>Clematis mandshurica</i>	미나리아재비과	Ranunculaceae	
모과나무	<i>Chaenomeles sinensis</i>	장미과	Rosaceae	
오수유	<i>Evodia rutaecarpa</i>	운향과	Rutaceae	S (9)
촉초	<i>Zanthoxylum piperitum</i>	운향과	Rutaceae	WP (21)
백단향	<i>Santalum album</i>	단향과	Santalaceae	S (15)
백부근	<i>Stemona japonica</i>	백부과	Stemouaceae	WP (15)
침향	<i>Aquillaria agallocha</i>	팔꽃나무과	Thymelaeaceae	R (7)
백지	<i>Angerica dahurica</i>	산형과	Umbellitea	R (18)
	<i>Ligusticum officinale</i>			
감송향	<i>Nardostachys chinensis</i>	마타리과	Valerianaceae	WP (13)
	<i>Kaempferia galanga</i>			

^a R, root; F, fruit; S, stem; and WP, whole plant

를 사용하였으며, 양성대조물질 Sodium azide는 멸균증류수에, 2-Aminofluorene 및 9-Amino acridine는 DMSO에 용해하여 사용하였다.

예비시험에서는 TA-98 및 TA-100을 사용해 16, 80, 400, 2000, 10000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 의 농도 범위로 시험하였는데, 500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 부터 치사효과가 나타났으며 그 이하의 농도에서도 콜로니수의 증가는 없었다. 따라서 본 시험에서는 최고농도를 250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 로 하고 공비를 2로 하여 31.2, 62.5, 125, 250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 의 4개 농도를 설정하여 시험하였다.

돌연변이원성의 여부는 3개 플레이트의 평균 콜로니수가 처리농도의 증가에 따라 3농도 이상에서 일관성있게 증가하면서 음성대조군에 비해 2배 이상일때 양성으로, 2배 미만인 경우에 음성으로 판정하였다.

IV. 결과

1. 식물체 조추출물의 감기억제활성

38종의 식물체 조추출물 중에서 후추과의 후추(*Piper nigrum*), 국화과의 목향(*Aucklandia lappa*), 녹나무과의 육계(*Cinnamomum cassia*), 목련과의 대회향(*Illicium verum*), 마디풀과의 대황(*Theum coreanum*), 소나무과의 적송(*Pinus densiflora*) 등이 강한 감기 억제 활성을 나타내었고 이외 콩과의 자단향(*Tilia amurensis*), 미나리아재비과의 목단피(*Paeonia suffruticosa*), 운향과의 촉초(*Zanthoxylum piperitum*), 오수유(*Evodia rutaceae*) 등은 중간 정도의 억제 활성을 보였으며 나머지 28종의 식물체는 활성이 약하거나 거의 활성을 보이지 않았다(표 3.2).

표 3.2. 전선침지법에 의한 식물체 추출물의 생쥐에 대한 기피활성

식물명	감기저해활성	
	AVS ^a	AVL ^b
<i>A. gramineus</i>	++	+
<i>A. vulgaris</i>	++	+
<i>B. carterii</i>	++	+
<i>A. lappa</i>	+++	+++
<i>D. camphora</i>	-	+
<i>H. odorata</i>	++	+
<i>A. erugosa</i>	+	+
<i>S. tenuifolia</i>	++	+
<i>C. camphora</i>	++	++
<i>C. cassia</i>	+++	+++
<i>G. horrida</i>	++	+
<i>G. glabra</i>	++	-
<i>P. santalinus</i>	++	++
<i>I. verum</i>	+++	+++
<i>M. officinalis</i>	++	-
<i>E. aromatica</i>	++	++
<i>P. suffruticosa</i>	++	++
<i>P. densiflora</i>	++	++
<i>P. nigrum</i>	+++	+++
<i>R. officinale</i>	+++	++
<i>L. foenum-graecum</i>	++	-
<i>C. mandshurica</i>	++	+
<i>C. sinensis</i>	++	+
<i>E. rutaecarpa</i>	++	++
<i>Z. piperitum</i>	++	+
<i>S. album</i>	++	+
<i>S. japonica</i>	++	-
<i>A. agallocha</i>	+	++
<i>A. dahurica</i>	++	-
<i>L. officinale</i>	++	++
<i>N. chinensis</i>	++	++
<i>K. galanga</i>	++	++

aAVL = (the length gnawed in each wire segment treated with test material/the length gnawed in each wire segment treated with ethanol) x 100.

bAVS = (the number of scars in each wire segment treated with test material/the number of scars in each wire segment treated with ethanol) x 100.

2. 생쥐에 대한 기피활성물질의 동정

1) 적송의 감기억제 활성

(가) 활성성분 분리

적송의 메탄올 조 추출물 20 g을 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트로 순차 분획하여 각각헥산 획분 2.5 g, 클로로포름 획분 1.6 g, 에틸아세테이트 획분 1 g, 물층 14.9g 얻었다(그림 3.1).

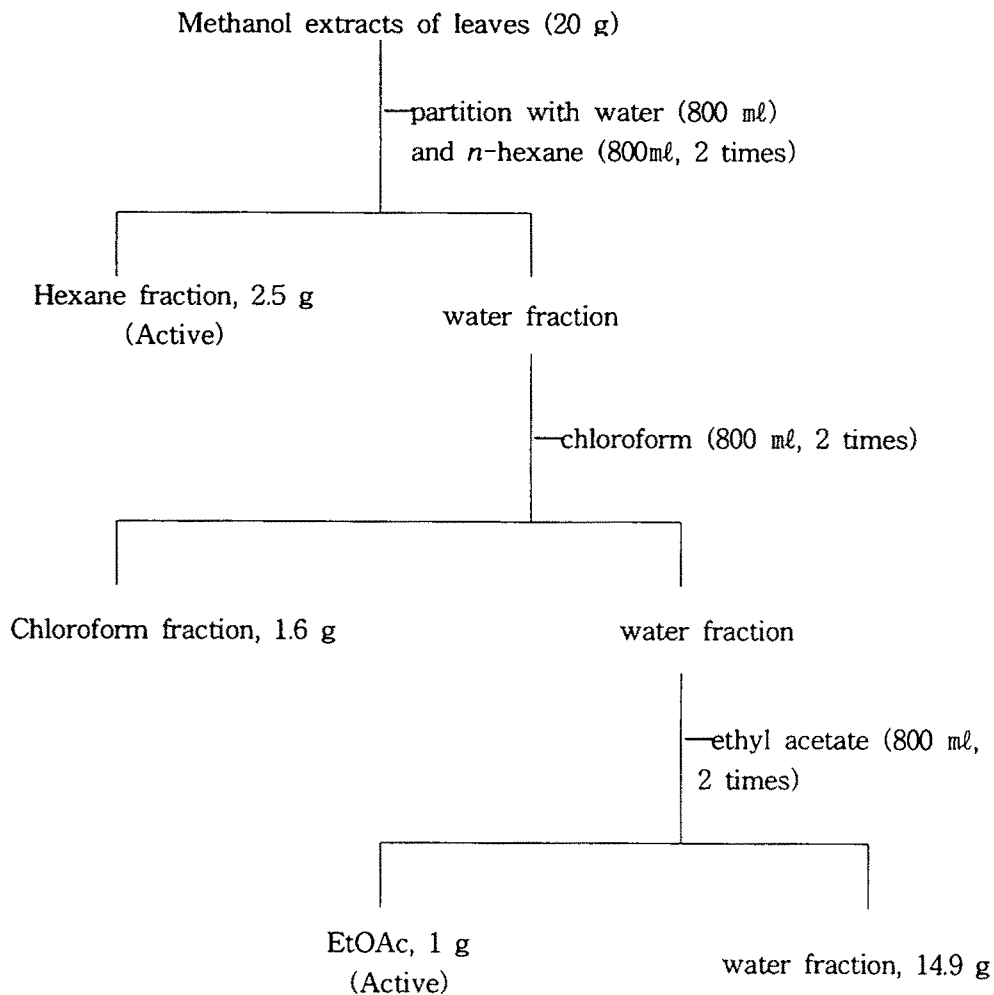


그림 3.1. 적송잎의 용매분획 과정

이들 각각 분획의 값기 억제 활성의 결과를 표 3.3에 나타내었다. 헥산층의 가해부위는 41곳으로 총 가해길이는 66 mm였다. 클로로포름층의 가해부위는 51곳, 총 가해길이 68 mm이었고, 에틸아세테이트층은 31곳, 총 가해길이는 41 mm였다. 대조구의 전선의 가해부위는 110곳, 총 가해길이 230 mm로, 이상의 결과에서 헥산과 에틸아세테이트 층에서 동일한 정도의 강한 활성을, 클로로포름층에서는 약한 값기 억제 활성을 보임을 알 수 있었다.

표 3.3. 쥐에 대한 적송잎 핵분의 기피효과

Fraction	Antignawing activity ^a	
	Number of scars (Mean ± S.D.)	Length of scars (mm) (Mean ± S.D.)
Hexane	5.1 ± 2.0ab	8.3 ± 2.4a
Chloroform	6.4 ± 2.3a	8.5 ± 3.0a
Ethyl acetate	3.9 ± 2.2b	5.1 ± 2.6a
Control	13.8 ± 2.7c	28.8 ± 15.4b

^aMeans followed by the same letter in each column are not significantly different [P=0.05; Duncan's multiple range test (SAS Institute, 1985)].

(나) 값기억제성분의 동정

강한 값기 억제 효과를 보인 헥산층 10 g을 silica gel column chromatography와 HPLC를 이용하여 그림 3.2의 과정으로 순차적으로 분리 정제 하여, 최종적으로 활성이 있는 물질 compound I (1.2 mg)을 순수 분리하였다.

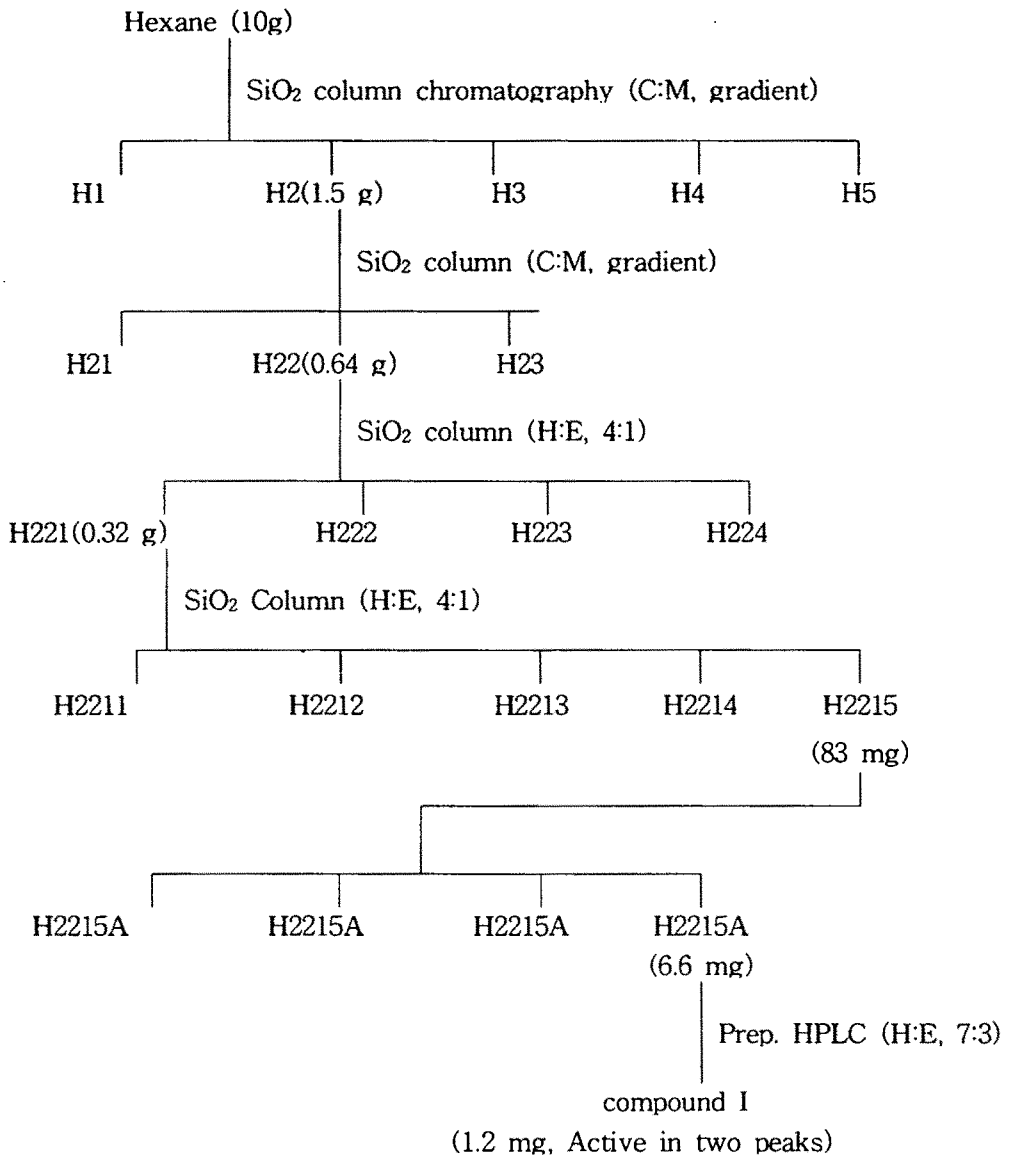
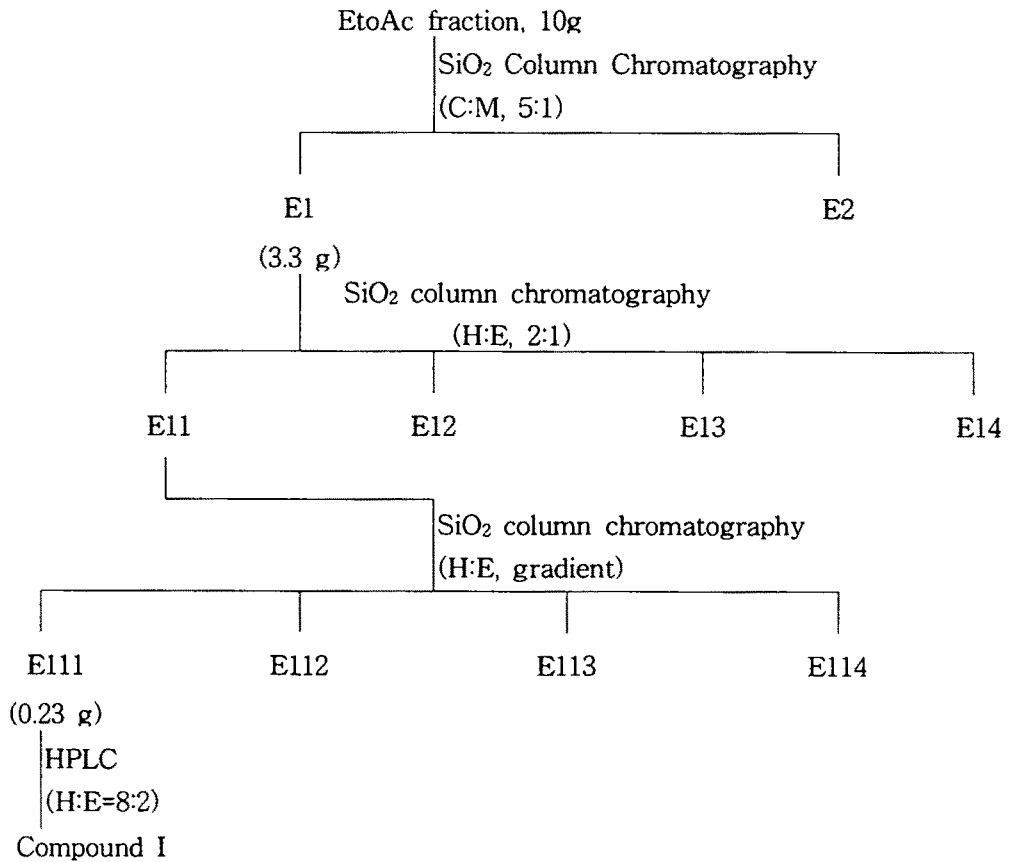


그림 3.2. 적송잎 헥산 획분으로 부터 쥐 기피성분의 분리 과정

공시 식물체 중 강한 활성을 보인 에틸아세테이트 획분을 실리카겔 크로마토 그래피와 고속액체크로마토그래피를 이용해 활성성분을 분리, 정제하였다 (그림 3.3).



(75 mg, Active in two peaks)

그림 3.3. 솔잎 에틸아세테이트 획분으로 부터 쥐 기피성분의 분리 과정

(다) 적송의 활성본체 동정

적송의 헥산 획분에서 분리 정제된 감기억제성분을 MS(그림 3.4), NMR(그림 3.5; 3.6), IR(그림 3.7), UV spectra(그림 3.8) 등의 기기분석법을 이용, 구조를 확인한 결과 dibutyl phthalate로 동정되었으며, 에틸아세테이트 획분에서 분리한 활성획분은 Gas chromatography(그림 3.9)와 α -pinene 표준품과의 MS(그림 3.10)으로 동정되었다(그림 3.11).

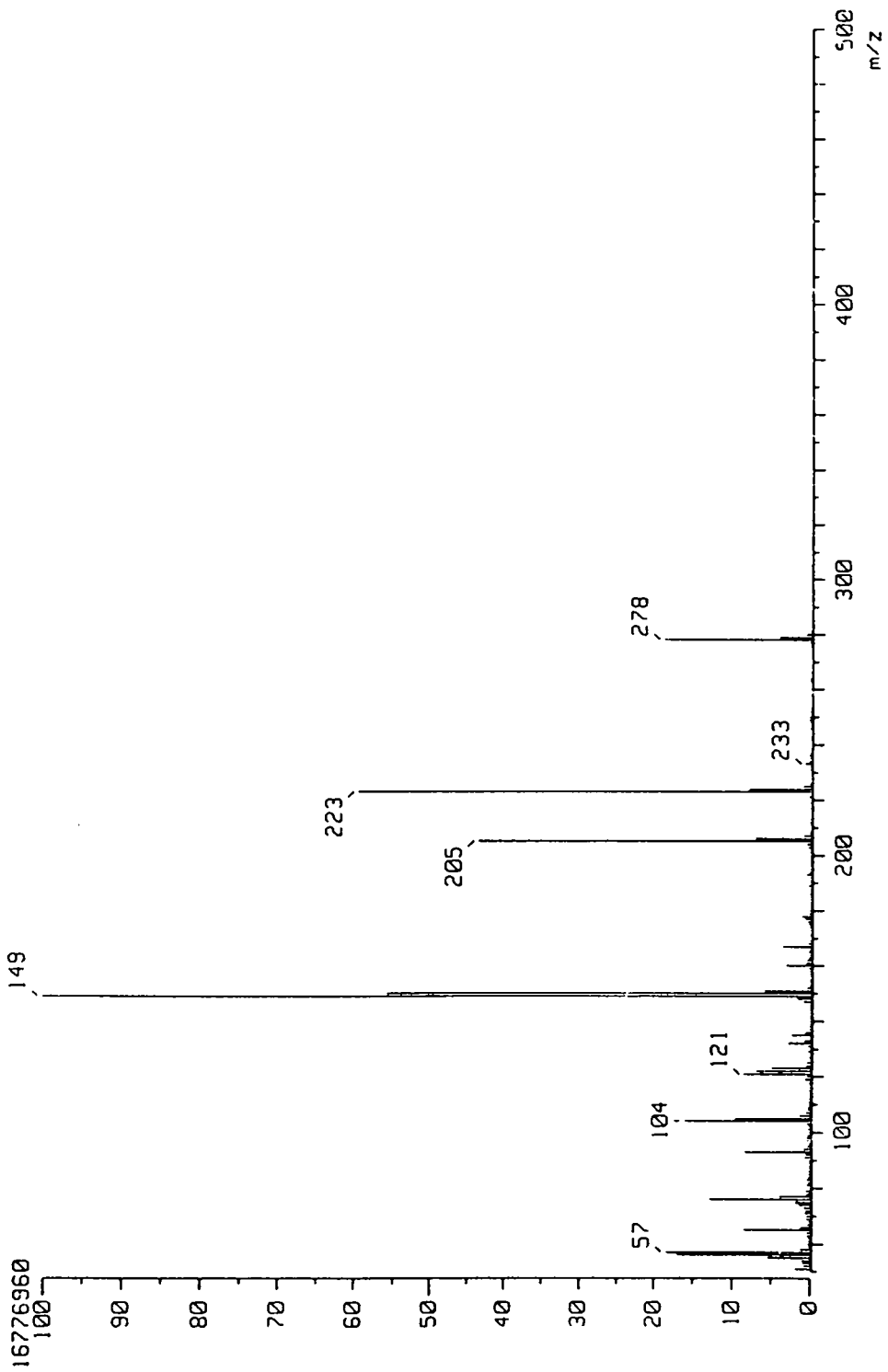


Fig3.4.EI-MS spectrum of dibutyl phthalate

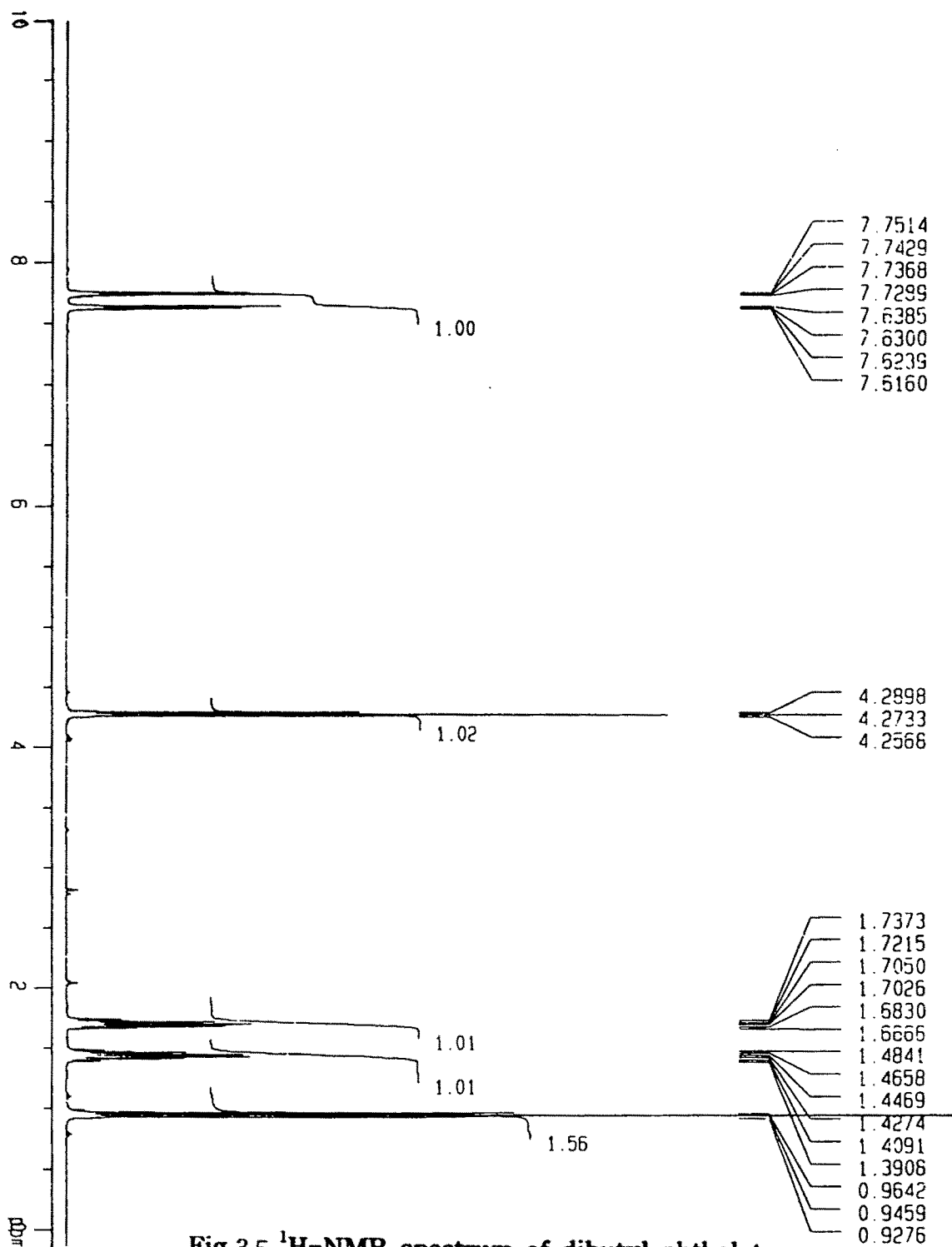


Fig.3.5. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of dibutyl phthalate

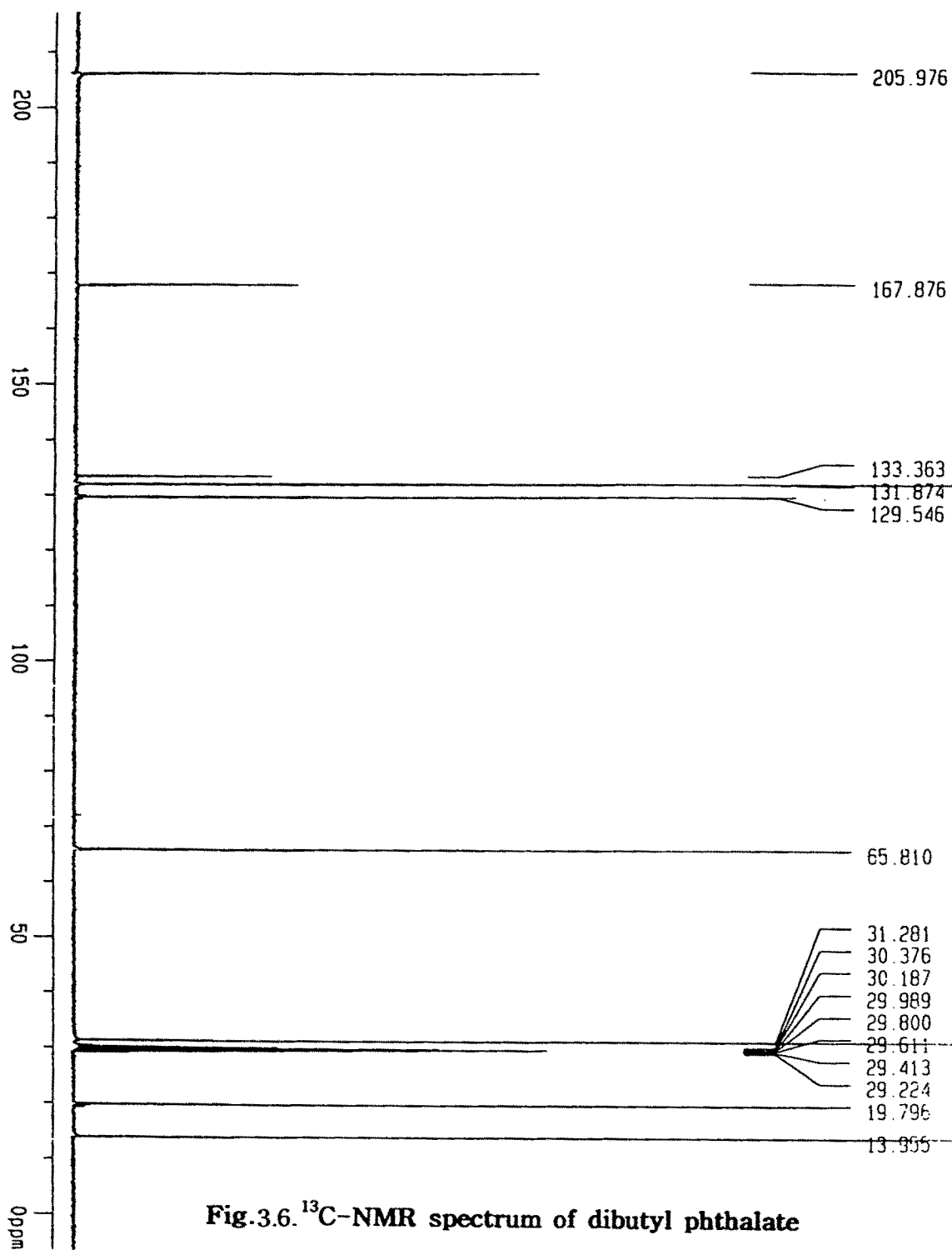


Fig.3.6. ^{13}C -NMR spectrum of dibutyl phthalate

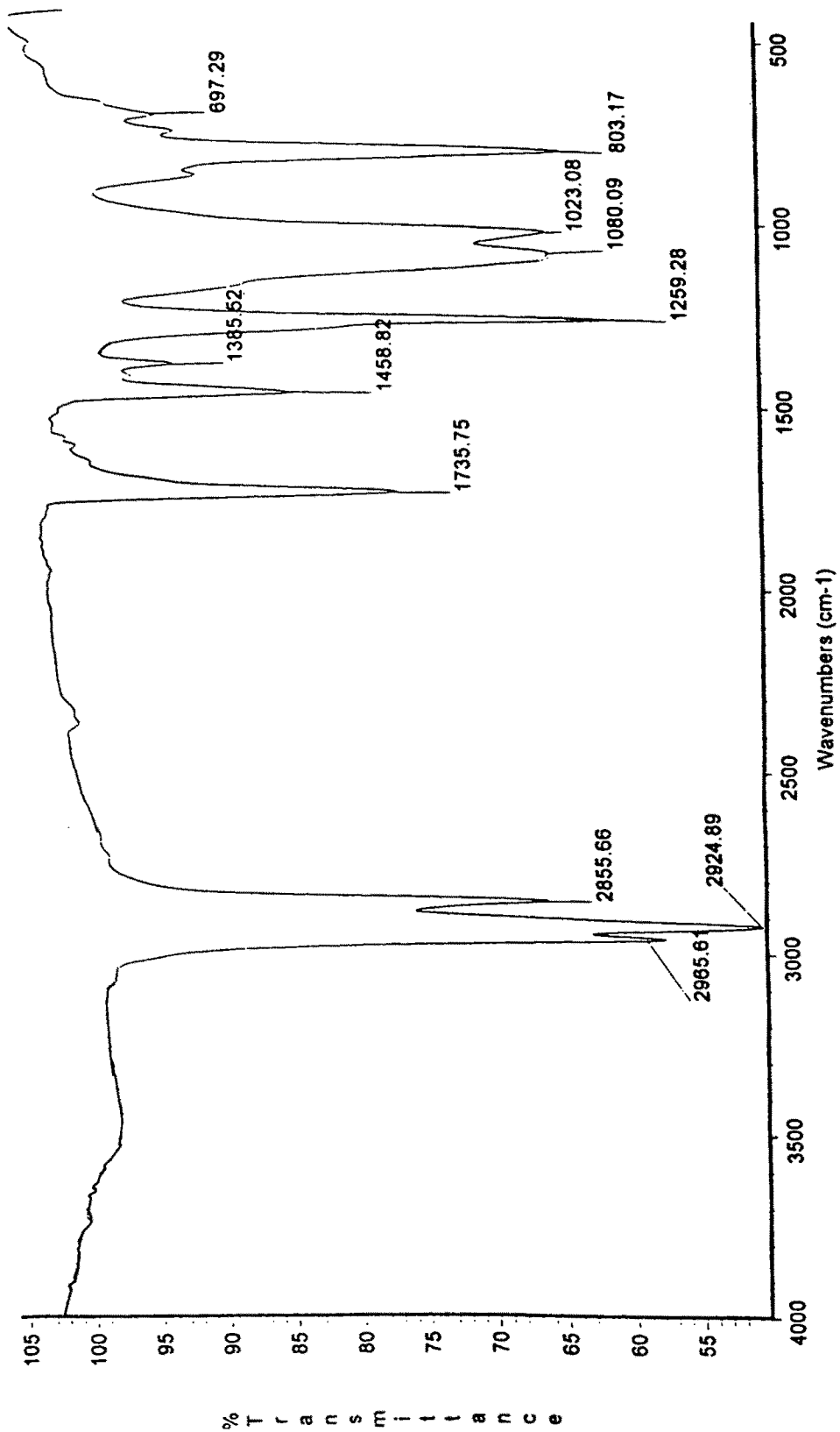


Fig.3.7. IR spectrum of dibutyl phthalate

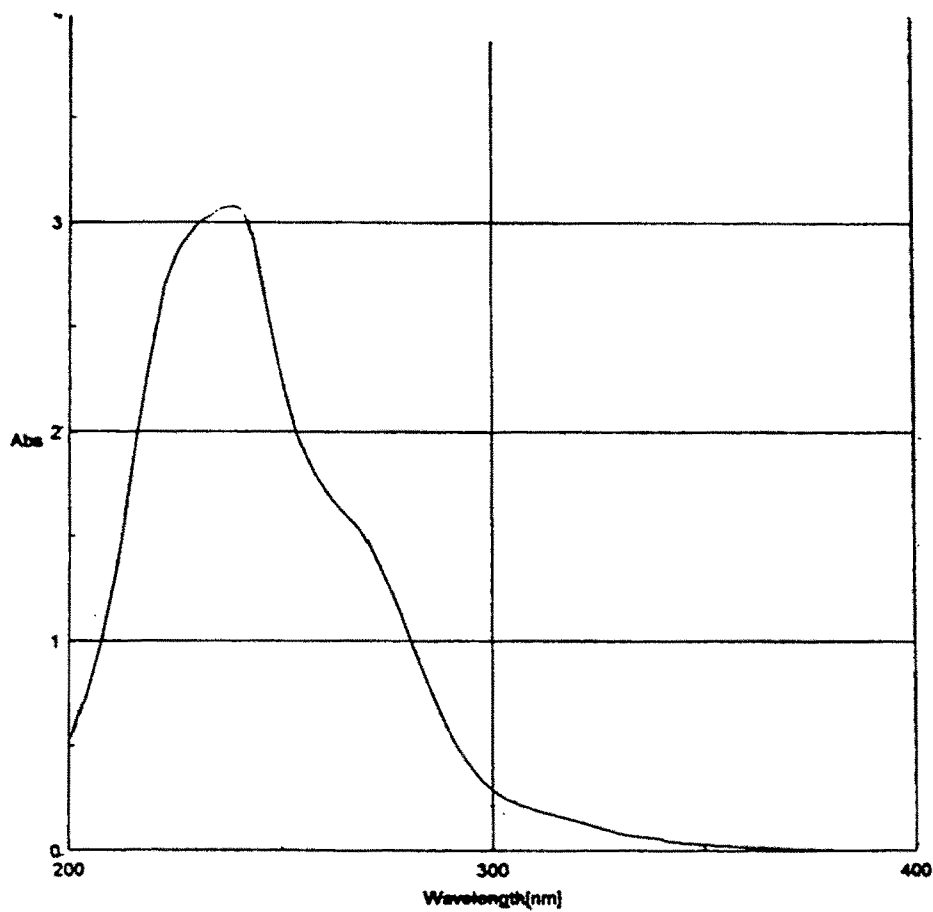


Fig.3.8. UV spectrum of dibutyl phthalate

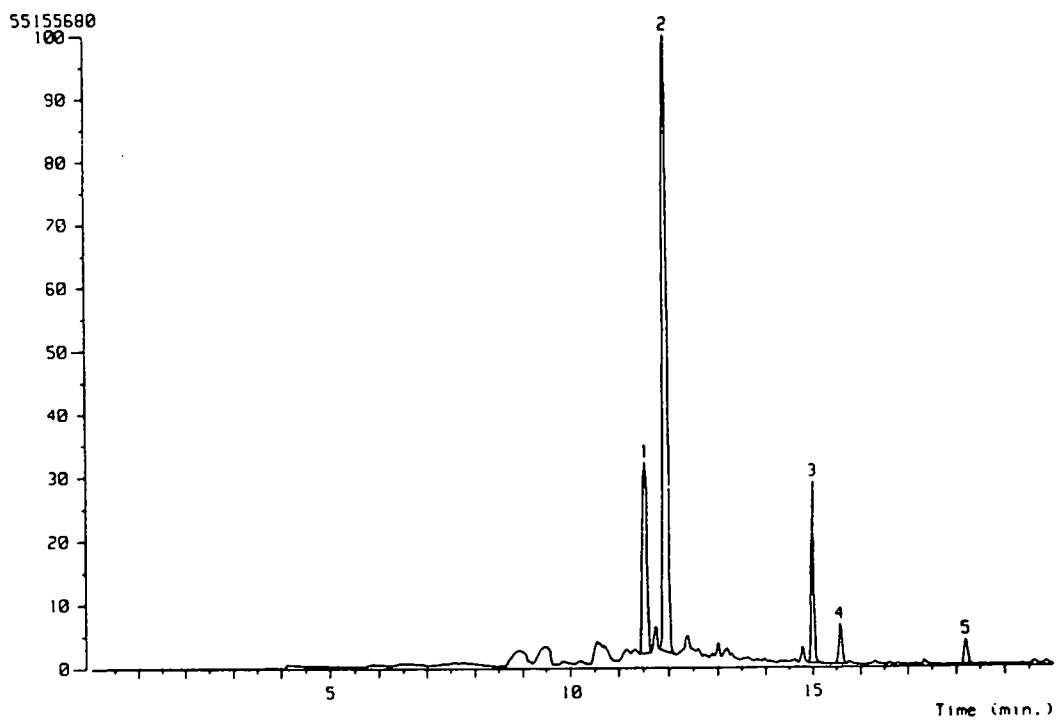
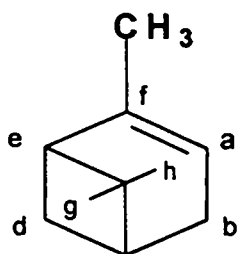


Fig. 3.9. Gas chromatography of E111 of *P. densiflora*

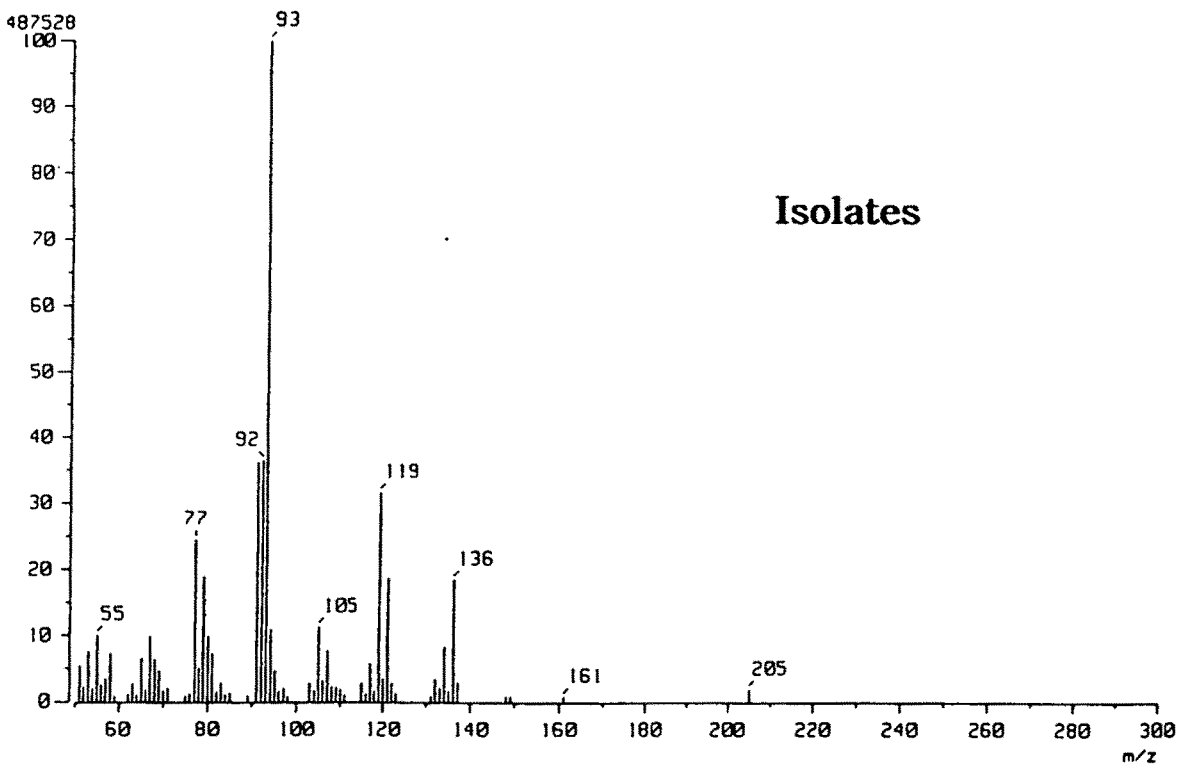
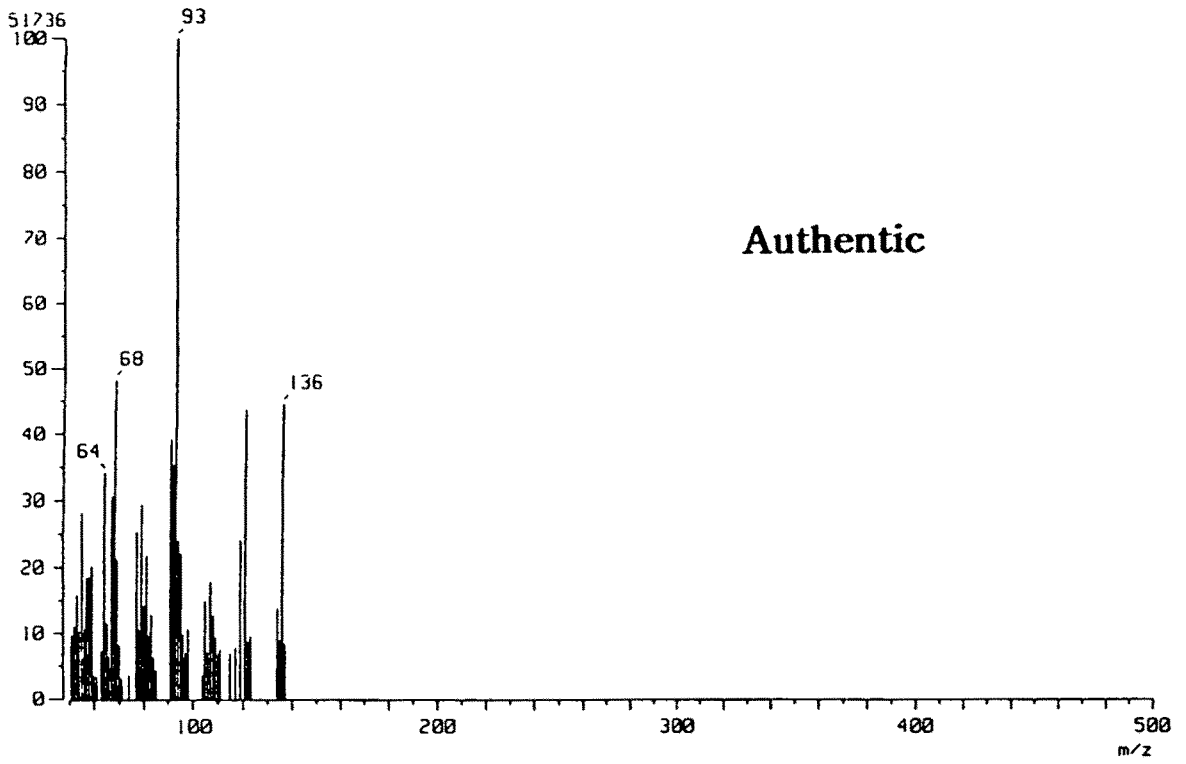
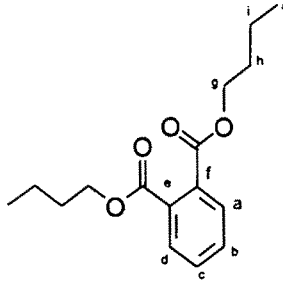
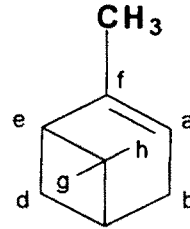


Fig. 3.10. EI-Mass spectrum of α -pinene



Dibutyl phthalate



α -Pinene

그림 3.11. 적송의 Dibutyl phthalate와 α -pinene의 구조

(라) 활성본체의 기피활성

α -Pinene과 1,2-benzenedicarboxylic acid dibutyl ester (dibutyl phthalate) 및 적송에 함유된 기존의 6종 테르펜화합물 (hexadecane, β -caryophyllene, naphthalene, β -pinene, camphor, menthol)의 생쥐에 대한 갇기 억제 효과는 표 3.4에 나타난 바와 같다.

Hexadecane이 가해부위 1곳, 총 가해 길이 1 mm로 가장 강한 갇기억제활성을 보였으며, 적송으로부터 분리된 dibutyl phthalate 및 α -pinene 은 각각 6곳, 12 mm와 5곳, 15 mm로 비교적 강한 활성을 나타내었다. 기타 테르펜 화합물 중 β -caryophyllene은 8곳, 19 mm이고 naphthalene은 8곳, 22 mm로 앞서의 두 물질, α -pinene 및 dibutyl phthalate에 비해 약한 갇기억제활성을 보임을 알 수 있었다. β -Pinene과 Menthol은 11곳, 54 mm와 12곳, 43 mm로 대조구의 결과인 15곳, 65 mm와 별다른 차이가 없었다.

표 3.4. 적송 성분의 쥐에 대한 15일 동안의 기피활성

Test material	Antignawing activity, (X ± SEM) ^a				
	Day 3	Day 6	Day 9	Day 12	Day 15
L-Menthol	1.0±0.1b	3.5±1.1b	4.8±0.8b	7.8±1.0b	9.3±1.1b
Cumine aldehyde	2.7±0.6b	3.1±0.5b	3.7±0.3b	6.0±1.1b	6.5±1.0b
Geraniol	2.2±0.2b	3.9±0.1b	4.9±0.1b	8.2±1.5b	9.7±1.5b
Linalool	2.4±0.8b	3.5±1.3b	4.4±1.0b	9.9±0.9b	10.7±0.6b
1,8-Cineole	1.4±0.5b	2.7±0.5b	3.2±0.5b	7.5±1.1b	8.6±0.9b
Dipentene	2.4±0.3b	3.5±0.4b	5.1±1.2b	6.8±1.5b	7.2±1.4b
β-Pinene	1.5±0.7b	2.4±0.7b	3.2±1.0b	4.4±1.4b	4.8±1.2b
α-Pinene	0.6±0.6b	1.2±0.2b	2.3±0.5b	3.7±0.1b	4.0±0.1b
Untreated	8.4±1.1a	11.1±0.8a	16.1±1.0a	24.6±1.7a	25.5±1.7a

^aMean followed by the same letter in each column are not significantly different[P = 0.05; Scheffe's test (SAS Institute, 1995)].

2) 계심의 값기억제 활성

(가) 억제활성 성분 분리

계심의 경우에는는 헥산 분획에서 강한 활성을 보여 실리카겔 크로마토 그래피와 고속액체 크로마토그래피를 이용하여 활성성분을 분리, 정제하였다(그림 3.12).

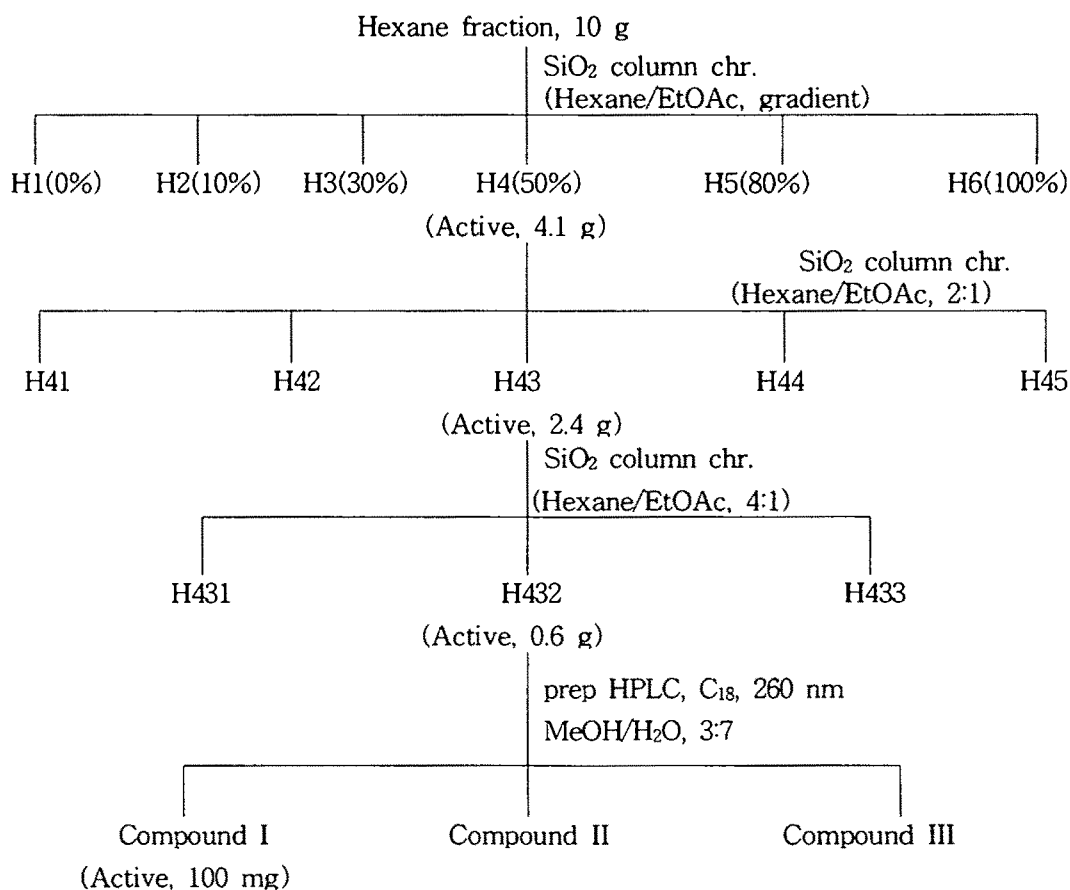
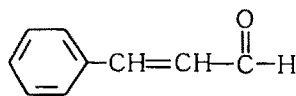


그림 3.12. 계심의 감기억제성분의 분리 정제 과정

(나) 억제활성 성분의 동정

계심의 감기억제성분은 아래 기기분석을 통해 cinnamaldehyde로 동정되었다(그림 3.13).

Cinnamaldehyde: MS(MW 132, C₉H₈O), EI-MS(70eV) m/z(% rel. int.); M⁺ 132 (3), 103 (2), 74 (83), 59 (100), 58 (75); IR (neat) max cm⁻¹; 2920, 1680, 1630, 1130; ¹H-NMR (CD₃OD 400MHz); σ 6.60 (dd, J = 8 and 18Hz), 7.35 (d, J = 18Hz), 7.1-7.7 (m), 9.52 (d, J = 8Hz); ¹³C-NMR (CD₃OD, 100MHz); σ 195.6, 154.4, 135.0, 132.1, 129.7, 129.5, 129.0, 128.9



trans-cinnamaldehyde

그림 3.13. *trans*-cinnamaldehyde의 구조

(다) 활성본체의 기피활성

일반적으로 식물체 내에 널리 알려진 12종 모노테르펜 화합물 (1,8-cineol, α -pinene, β -pinene, cinnamyl alcohol, menthol, geraniol, cinnamaldehyde, dipentene, linalool, eugenol, cuminaldehyde, cinnamic acid)의 활성 비교 실험에서 α -pinene, β -pinene, cinnamaldehyde 순으로 활성을 보였으며 그 효과는 15일간 지속되었다(표 3.5). Menthol, geraniol, linalool, eugenol, cinnamyl alcohol, cinnamic acid 등은 앞서의 화합물보다는 비교적 약하나 대조구와 비교시 감기억제활성을 지속적으로 나타냄을 알 수 있었다.

표 3.5. 계심 성분의 쥐에 대한 15일 동안의 기피활성

화 합 물	감기 억제 활성, mg ($X \pm SEM$) ^a				
	3 일	6 일	9 일	12 일	15 일
<i>trans</i> -Cinnamaldehyde	2.0±0.5c	2.6±0.6c	3.4±0.6c	4.2±0.4e	5.1±0.2d
Cinnamyl alcohol	1.8±0.4c	3.1±0.2cd	4.2±0.2c	6.5±0.5de	7.1±0.2d
Salicylaldehyde	6.2±0.5ab	10.2±0.7ab	15.2±0.7a	18.6±0.7b	20.4±0.5b
Eugenol	2.9±0.5c	6.5±0.7bc	8.3±0.6b	10.5±0.6c	11.2±0.4c
<i>trans</i> -Cinnamic acid	3.2±0.5bc	6.3±1.1cd	8.3±0.5b	9.9±0.4cd	11.5±0.3c
Untreated	8.7±0.8a	11.4±0.5a	16.1±0.9a	25.5±1.1a	27.9±0.7a

^aMean followed by the same letter in each column are not significantly different [P = 0.05; Scheffe's test (SAS institute, 1995)].

3. 돌연변이원성

S-9 mix의 존재 및 비존재하에서 *S. typhimurium* 4 균주에 대한 cinnamaldehyde의 돌연변이원성 실험을 실시한 결과, TA-1535 및 TA-100 균주의 양성대조군인 SA 처리구와 TA-1537 균주의 양성대조군인 9-AA 처리구 및 TA-98 균주의 양성대조군인 2-AF 처리구에서는 각각 복귀돌연변이 콜로니수가 유의적인 증가를 나타낸 반면, cinnamaldehyde 처리구는 시험한 모든 균주의 전농도군에 걸쳐서 처리량 증가에 따른 복귀돌연변이 콜로니수의 유의적인 증가가 관찰되지 않았고, 또한 음성대조물질로서 DMSO만을 처리한 처리구와도 거의 비등한 수의 콜로니가 관찰되었다. 따라서, cinnamaldehyde는 본시험 조건하에서 *S. typhimurium* TA-1535, TA-1537, TA-98 및 TA-100의 4개 시험균주에 대해 $\text{His}^- \rightarrow \text{His}^+$ 로의 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 판단되었다.

고 찰

설치류는 곡물, 저장식품, 포장물, 건축구조물에 심각한 피해를 주고 있으며, 무엇보다 고도 정보화 사회에 필수요소인 컴퓨터 설비와 전력, 전화 케이블 등을 침해하여 엄청난 경제적 피해를 야기하고 있으며 인명에까지 위협을 주는 상황을 유발하고 있다. 울산과 같은 공단 지역에서 설치류에 의해 야기되는 누전으로 인한 일시적 정전의 피해는 수십 억에 이르며(조선일보, 1996) 전 세계적으로 원인을 알 수 없는 화재는 모두 쥐에 의한 것이라는 견해도 있다.

이러한 설치류 방제를 위해 살서제를 사용해 왔으나 비대상 물질에 대한 2차 독성, 기피성, 환경오염원 등의 여러 문제점이 대두되었고 이를 해결하기 위해 설치류를 직접 죽이기보다는 유인제나 기피제와 같은 대체 방제제가 바람직한 방제책으로 제시되기에 이르렀다.

테르펜, 알칼로이드, 페놀성 화합물 등 식물체가 방어물질로서 분비하는 이차 대사산물에 근거, 천연물 유래의 새로운 설치류 제어물질의 개발이 활발히 진행, 기존의

합성 제어물질을 대체할 새로운 개념의 구체책으로 제시되어 왔는데 박하 정유 (Botrell, 1932)나 삼나무 잎 정유(Harding, 1985), *Areca catechu* 식물의 열매나 목재 (Cross, 1939), *A. absinthium*로부터 얻은 테르펜 화합물인 thujone (Harding, 1985), 나한백(*Thujopsis dolabrata* var. *hondae*)으로부터 새로운 기피 물질인 cavacrol(Ahn et al., 1995)등이 알려져 있다.

본 연구는 38종 식물체의 조추출물을 mouse를 대상으로 갯기 억제 활성을 탐색하여 천연물 유래의 갯기 억제제를 개발하고자 수행되었다. 실험 식물체 메탄올 조추출물 중 비교적 후추과의 후추(*Piper nigrum*), 국화과의 목향(*Aucklandia lappa*), 녹나무과의 계심(*Cinnamomum cassia*), 목련과의 대회향(*Illicium verum*), 마디풀과의 대황(*Theum coreanum*), 소나무과의 적송(*Pinus densiflora*), 제비꽃과의 계심(*Viola virginata*) 등이 강한 갯기 억제 활성을 나타내었는데, 이 중 적송의 약리 작용은 항염증 작용, 살균작용, 살충작용등으로 진경제, 관절염 치료제, 기침가래약의 성분으로 널리 쓰이고 있으며(문, 1991) 쥐 뿐만 아니라 곤충, 미생물 등에 의해 직접적인 피해를 받지 않는 것으로 알려져 있다. 적송에 bark beetle-vectored fungus *Leptographium terebrantis*를 접종시 방어물질로서 phenolics와 α -pinene, β -pinene, carene, limonene, camphene, myrcene의 농도가 높아졌다는 연구 결과가 있다(Klepzig et al., 1995). 1989년 Jacobson은 새로운 농약활성자원으로서 참중나무과(meliaceae), 운향과(rutaceae), 국화과(Asteraceae), 꿀풀과(labiatae) 등을 제시한 바 있다. 아직 까지 적송 및 계심유래의 살서제나 곤충 기피제는 알려진 바가 없다.

적송의 메탄올 추출물을 각종 크로마토그래피를 이용하여 분리, 정제하여 생쥐에 대하여 갯기 억제 활성을 보이는 물질을 최종적으로 얻었으며, 각종 spectral techniques (EI-MS, ^1H 과 ^{13}C NMR, IR)을 이용하여 이 물질을 aromatic benzene ring의 방향족 화합물인 1,2-benzenedicarboxylic acid dibutyl ester (dibutyl phthalate)와 테르펜화합물인 α -pinene으로 구조 결정하였다. 또한 계심의 활성본체는 *trans*-cinnamaldehyde로 구조 동정하였다. 한편, 적송의 화학 성분에 관한 보고(문, 1991)는 있으

나, 생쥐에 대한 기피활성은 본 연구에서 처음으로 밝혀졌다.

적송 잎의 정유에는 α -pinene, β -pinene, camphen, borneol phellandrene, limonene 등이 함유되어 있다(Namba 1986; 문,1991). 이러한 정유의 조성은 시기별로 다른데 특히 모노테르펜 함유량은 이른 봄 부터 6월 사이에는 limonene, borneol이 많고 그 이후부터는 α -pinene이 다량 존재한다(문, 1991). 이처럼 α -pinene은 곤충이나 병원체로부터 가해를 받으면 방출되는 소나무 屬에 풍부한 대표적 휘발성 테르펜 화합물이라 할 수 있다. α -pinene은 특징적인 냄새를 지니고 있으며 대부분의 절지 동물에 불쾌감을 주는 것으로 보고되어 있다.

Dibutyl phthalate의 경우 1992년 미국에서 발표된 연구 결과에 의하면 의복 주입식 곤충 기피제로 알려져 있다. 또한 brown alga (*Stoechospermum marginatum*)에서도 분리된 바 있으며(Wahidulla et al., 1995), chigger mite (*Eutrombicula hirsti*) (Frances et al., 1994), 누에의 기생충인 uzi fly (Barman et al., 1990), 모기(Rutledge et al., 1994) 등의 기피제로 보고된 바 있다. Dibutyl phthalate는 무색, 무미, 약한 암모니아성 냄새를 지니는데 대개 쥐류와 생쥐류에 대한 생식 능력 저해 효과를 지니며 (Cummings et al., 1987) 인간보다는 쥐의 피부에 대한 침투성이 더 강하다고 보고되어 있으며(Scott et al., 1987), 강한 피부자극 작용을 가지고 있어 이 물질의 기피작용은 피부자극과 독성에 의한 것으로 생각된다.

본 연구에서 α -pinene과 dibutyl phthalate는 높은 휘발성을 갖는데 그들의 잠기억 제활성도는 비슷하나 이들이 지니고 있는 물질로서의 특성에 따라 각각 냄새에 의한 기피와 접촉에 의한 피부자극으로 인해 잠기억 제 활성을 보이는 것으로 추정된다. Dibutyl phthalate는 GABA(γ -aminobutylic acid) receptor agonist로 작용하는 것으로 추정되고 있다(Kaneyuki, 1989). α -pinene과 dibutyl phthalate의 정확한 작용기구를 규명하기 위해선 마우스의 감각기관과 행동양상에 대한 이해와 더 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다. Cinnamaldehyde 역시 높은 휘발성 갖는다.

이러한 높은 휘발성이라는 단점을 보완, 살서제로서의 활성을 지속시키기 위해서

공기 중에 서서히 방출시키는 담체(carrier)의 활용이 요구된다. 이러한 담체로는 lacquer, sodium silicate, paraffin이 보고된 바 있으며(Harding, 1985), thujone oil과 lacquer의 혼합액(12/88)을 페인트에 처리시 3-5 년간 설치류에 대한 기피효과가 지속되었다고 하였다(Harding, 1985). 또한, 大久保 등(1989)은 polyvinyl alcohol hydrogel 과 ethyl glycol을 담체로 이용 시 상당기간 효과가 있음을 보고한 바 있다. 이러한 여러 담체 등을 이용, 개발하여 휘발성 높은 활성물질의 단점을 보완하면 전선이나 케이블, 목재 등에 피복 처리하여 보다 큰 보호 효과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

적송으로부터 분리해낸 값기 억제 활성물질인 α -Pinene과 dibutyl phthalate는 기존의 적송 내에 함유된 hexadecane, β -caryophyllene, naphthalene, β -pinene, camphor, menthol 등의 모노테르펜 화합물과의 활성 비교 실험에서 hexadecane보다는 약하지만 비교적 강한 활성을 보였다. 설치류에 대해 기피활성을 나타내는 목재들은 주로 기피성분의 독성 혹은 특이한 맛이나 냄새 등으로 인하여 기피작용을 나타내는 것으로 알려져 있는데, 식물에 함유된 성분 중에 알칼로이드는 그 독성으로 인하여 기피작용을 나타내나, α -pinene과 같은 테르펜 화합물은 독성에 의한 것이라기 보다 맛이나 냄새에 의한 것으로 알려져 있다. 식물체 기원 방향성분들과의 비교실험에서 계심에서 분리한 활성성분인 *trans*-cinnamaldehyde는 여타의 화합물(cinnamyl alcohol, salicylaldehyde, eugenol, *trans*-cinnamic acid)들 보다 강한 기피활성을 나타내었다.

식물 그 자체 혹은 식물체 추출물은 비교적 단기간 쥐에 대해 기피효과를 발휘하는 것으로 알려져있다(Harding, 1985). α -pinene과 다른 식물체내에 널리 알려진 모노테르펜 화합물들 즉 1,8-cineol, α -pinene, β -pinene, cinnamyl alcohol, menthol, geraniol, cinnam aldehyde, dipentene, linalool, eugenol, cumine aldehyde, cinnamic acid의 활성지속력에 대한 실험에서 α -pinene, β -pinene, cinnam aldehyde 순으로 높은 지속성을 나타내어 휘발성이 높은 물질임에도 불구하고 비교적 오랜 기간인 15일간 그 활성이 유지되었다.

현재 국내에선 강한 기피 활성을 지닌 cycloheximide 조차 사용되지 않고 있는 실

정이나 위의 물질들과 함께 보다 확실한 응용방법을 제시한다면 상품포장, 전화선, 목재에 대한 피해나 누전으로 인한 피해 등 설치류로 인해 야기되는 여러 피해들을 막을 수 있을 것이다. 휘발성 높은 물질의 활성을 지속시키기 위한 담체의 사용이 그 예라 할 수 있으며, 일본의 경우 기피제인 capsaicin을 특수 수지로 하여 미세한 캡슐을 한데 섞어 쥐가 갇으면 캡슐이 터져 쥐를 괴롭게 하는 매운 성분이 방출되게 하였다. (조선일보, 1994). α -Pinene, dibutyl phthalate, cinnamaldehyde는 쥐에 대한 갇기 억제 활성 뿐 아니라 살균효과와 곤충에 대한 기피제로서의 활성을 지니고 있기 때문에 실제 사용 범위는 다양하다 할수 있다. 또한 인체에 대한 무독성을 입증하기 위해 여러 실험이 수행되었고 이는 현재 의복에 주입되어 모기나 진딧물의 기피제로 활용되고 있음에서 알 수 있다. 이처럼 dibutyl phthalate, α -pinene, cinnamaldehyde의 장점을 극대화하고 단점을 보완할 여러 물리, 화학적 방법이 보충된다면 기존의 cycloheximide에 버금가는 기피제로서의 활용이 가능할 것이다.

이상에서 보는 바와 같이 본 연구 결과 밝혀진 물질은 전선이나 케이블 또는 목재 등에 피복 처리함으로써 설치류로부터 보호, communication system과 목재 가공품 보호, 기타 설치류의 갇기 습성에서 비롯되는 모든 피해에 대한 방제책으로 활용될 수 있을 것이다. 또한 설치류는 통신시설에 막대한 손실을 초래하기 때문에 그 시장 규모가 크고 선진국에 있어서는 설치류에 대한 기피제 개발에 진력하고 있는 점을 감안할 때 본 연구에서 밝힌 적송으로부터 2종의 화합물(dibutyl phthalate 및 α -pinene)과 계심으로부터 cinnamaldehyde는 갇기 억제성분으로서 새로운 설치류 기피제로서의 활용이 기대된다.

VI. 인 용 문 헌

Ahn, Y. J., T. Okubo and M. Kim. 1992. Repellent activity of essential oils and

plant extracts against rodent. Abstract. Korean Soc. Entomol., p 19. Korean Soc. Entomol. Seoul Nat'l University, Suwon, November 7th.

Ahn, Y. J., Lee, S. B., and Okubo, T., Kim, M. 1995. Antignawing factor of crude oil derived from *Thujopsis dolabrata* S. et Z. var *hondai* sawdust against mice. *J. Chem. Ecol.* 21(3): 263-271.

Barman, A. C., Pasha, M. K., and Nahar, A. 1990. A study on the control of uzi fly, *Tricholyga bombycis* (Beck) in silkworm, *Bombyx mori* [in Bangladesh]. *Bull. Sericul. Rer.* 1: 65-68.

Botrell 1932

Cross 1939

Cummings, A. M., and Gray, L. E., Jr. 1987. Dibutyl phthalate: Maternal effects versus fetotoxicity. *Toxicol. Lett.* 39(1): 43-50.

Frances 1994

Gratz 1988

Harding, N. T. 1985. Rodent repellent paint and bars. U.S. Patent number 4: 654.

Johri 1993

Kaneyuki, H., 1989. Effects of muscimol on aggressive behaviors induced by clonidine in mice. *Jap. J. Pharmacol.* 9(3): 281-287.

Klepzig, K. D., Kruger, E. L., Smalley, E. B., and Raffa, K. F. 1995. Effects of biotic and abiotic stress on induced accumulation of terpenes and phenolics in red pines inoculated with bark beetle-vectored fungus. *J. Chem. Ecol.* 21(5): 601-626.

Koehler, A. E. and Johnson, R. J. 1983. Rodent repellents for conservation agriculture. Proc, Nebraska Academy of Sciences, Nebraska Wesleyan University, Lincoln, Neb, 11.

李漢一, 1994, 衛生昆蟲學, 高文社, 345-381.

문관심, 1991. 약초의 성분과 이용, 일월서각, 114-116.

Namba 1986

Rice 1993

Scott, R. C., Dugard, P. H., Ramsey, J. D., and Rhodes, C. 1987. In vitro absorption of some o-phthalate diesters through human and rat skin. *Environ. Health Perspect.* 74: 223-227.

Traub, R., Dewitt, S., Welch, and Newman, D. 1950. Toxicity and repellency to rats

of acticione. *J. Am. Pharm. Assoc.* 39(10): 552.

Wahidulla, S., and De-Souza, L. 1995. Phthalte esters from the brown alga *Stoechospermum marginatum*, *Bot. Mar.* 38(4): 333-334.

제 4 절 종합결과

1. 살충활성 및 활성본체의 대량생산체계 확립

한방식물 20종의 주요 유해생물 7종에 대한 살충활성 스크리닝 결과 벼멸구의 경우, 은행나무잎에서 100%, 정향, 후추, 천궁, 울금에서 80% 이상의 살충율을 보였고, 배추좀나방에 대해서는 후추, 천궁, 울금이 80% 이상의 살충율을 보였다. 점박이용애에 대해서는 마에서 80% 이상의 살충율을 볼 수 있었다. 담배거세미나방과 복숭아혹진딧물에 대해서는 강한 살충활성을 나타내는 식물체는 없었다. 쌀바구미와 팔바구미의 경우, 처리 72시간 후에 15종 식물체들 중에서 목단피(모란의 뿌리 껍질), 정향 및 석창포가 쌀바구미에 대해서 살충활성을 나타내었으나, 15종 식물체 모두 팔바구미에 대해서는 어떤 활성도 나타내지 않았다.

국내산 식물 150종 식물체의 메탄올 조추출물의 주요 농업해충 5종에 대한 살충활성 스크리닝 결과, 벼멸구에 대해 초피나무 수피, 편백 잎, 비목나무 잎 추출물에서 95%이상의 살충율을 나타내었고, 배추좀나방에 대해서는 초피나무 수피 추출물에서 70%의 살충율을 보였으나, 기타 식물체의 경우에는 거의 활성을 나타내지 않았으며, 담배거세미나방에 대한 활성은 모든 식물체들의 활성을 관찰할 수 없었다. 점박이용애에 대해서는 보리밥나무 잎, 광대싸리 잎 + 줄기, 두릅나무 잎, 초피나무 수피, 참가시나무 잎과 모새나무 잎 추출물에서 80% 이상 살비효과를 보였다.

제주도산 식물체 26종 살충활성 스크리닝 결과, 벼멸구에 대해 검은재나무, 곰의말채, 굴피나무, 말채나무, 백목련, 비자나무에서 80-90%의 살충율이 관찰되었고, 배추좀나방에 대해서는 개뻗나무, 검은재나무, 곰의말채, 괴불나무, 굴피나무, 까치박달, 담팔수, 돈나무, 때죽나무, 말채나무, 먼나무, 비자나무등에서 70-80%의 살충율을 보였으나, 역시 담배거세미나방에 대한 활성은 식물체 모두에서 관찰되지 않았다. 점박이용애의 경우에는 개뻗나무, 검은재나무, 곰의말채, 괴물나무, 구실жат밤나무, 굴피나무, 다정큼나

무, 담팔수, 돈나무, 때죽나무, 말채나무, 먼나무, 모람, 무환자나무, 백목련, 비자나무등에서 70-80%의 살비활성을 나타내었다.

국내산 미곡 22종의 벼멸구, 복숭아혹진딧물, 점박이용애에 대한 살충활성을 검정한 결과, 늘보리, 흑향미의 메탄을 추출물이 벼멸구에 대하여 강한 살충활성을 나타내었고, 복숭아혹진딧물에 대해서는 메밀 메탄을 조추출물이 5000, 2500ppm에서 강한 살충활성을 나타내었으며, 조, 기장, 밀, 쇠보리, 수수, 참깨, 흑향미 및 현미참쌀의 메탄을 조추출물들은 점박이용애에 대하여 5,000 및 2,500ppm 농도에서 강한 살충활성을 보였다. 25종의 콩과 종자 추출물의 벼멸구, 배추좀나방, 복숭아혹진딧물, 담배거세미나방 및 점박이용애에 대한 살충활성은 관찰되지 않았다.

인도산 식물체 *Cassia tora* 외 49종의 3종 주요 농업해충에 대한 살충스크리닝 결과 살충활성은 *Annona squamosa* 종자, *Adhotoda vasica* 잎, *Nerium indicum* 줄기, *Pongamia pinnata* 종자 추출물이 벼멸구, 배추좀나방, 복숭아혹진딧물에 대하여 90% 이상의 살충효과를 보였다.

울금, 정향과 은행나무잎에 함유되어 있는 활성성분을 정제, 동정한 결과 울금의 *ar-turmerone*이 1,000 및 2,000 ppm 농도에서 벼멸구와 배추좀나방에 대해 100% 살충활성을 보여주었고, 500 ppm에서는 각 층에 대해 60%와 81%의 살충활성을 보였다. 또한 *ar-turmerone* 1,000 ppm에서 토마토역병과 밀녹병에 대하여 100% 살균활성을 나타내었고, 500 ppm에서는 90%의 살균활성을 보여주었다.

정향의 쌀바구미에 대한 살충활성성분으로서 *eugenol*을 분리하였다.

은행나무 잎의 벼멸구에 대한 강한 살충활성은 trilactone diterpene계 화합물인 *ginkgolide A*, *ginkgolide B*, *ginkgolide C*이다. 이들의 살충력을 기존 사용중인 *diazinon* 및 *carbofuran*과 *fenobucarb*등의 합성농약과 감수성 계통 벼멸구에 대해 비교한 결과, *ginkgolide C*가 *diazinon*과 비슷한 살충력을 나타내었다. 이처럼 우수한 은행잎의 살충성분의 대량생산을 위한 연구 결과, 은행잎 추출물이나 혈액개선제 추출후 남은 부산물 300g을 이용해 대량생산 기술을 개발하였다.

이상 식물체 기원성 살충활성물질 갖는 화합물들에 대한 산업 응용성을 고려할 때 가장 응용도가 높다고 판단된 은행의 ginkgolide C와 bilobalide의 생쥐에 대한 급성독성을 조사한 결과 LD₅₀ 값이 1000 mg 이상으로서 독성이 낮았으며, 또한 울금의 ar-tumerone과 은행의 ginkgolide C의 돌연변이원성을 조사한 결과, 전자는 *S. typhimurium* TA-1535, TA-1537, TA-98 및 TA-100의 4개 시험균주에 대해 His → His'로의 복귀돌연변이를 유발하였으나, 후자는 돌연변이를 유발하지 않았다.

2. 섭식저해 활성

식물체 48종의 배추좀나방과 담배거세미나방에 대한 섭식저해활성을 조사한 결과 (표 3), 황련, 정향, 유향, 백단향, 석창포, 오수유, 백부근, 천궁, 울금, 은행, 용뇌, 쑥, 계심, 축초, 검은재나무, 곰의말채, 괴물나무, 굴피나무, 까치박달, 담팔수, 때죽나무, 말채나무, 무환자나무, 비자나무 등이 배추좀나방과 담배거세미나방 유충에 대하여 강한 섭식저해활성을 나타내었다. 이 중 황련의 섭식저해활성을 동정한 결과, isoquinoline alkaloid인 berberine과 palmatine이 저해활성을 보여, 이들의 활성을 농도에 따라 조사한 결과, 흰개미 및 배추좀나방 유충에 대해 berberine은 0.5 mg, 0.25 mg에서 흰개미에 대해 강한 저해활성을 보였고, palmatine의 경우 berberine에 비하여 약한 활성을 보였으며, 또한 전자는 배추좀나방유충에 대해서도 125 ppm 농도에서 강한 섭식저해활성을 보였으나, 후자는 전자에 비해 같은 농도에서 약한 활성을 보였다.

한편 저장물에 대해 주요 해충인 쌀바구미(*Stophilus oryzae*)와 팥바구미(*Callosobruchus maculatus*)에 대한 21종 식물체의 기피 및 살충활성을 조사한 결과 목단피(모란의 뿌리 겹질)가 쌀바구미에 대해서 100%의 기피활성을 나타내었고, 정향이 80%의 활성을 보였으나 21종 식물체 모두 콩바구미에 대해서는 어떤 활성도 나타내지 않았다.

3. 쥐에 대한 감기억제활성

38종의 식물체 중에서 후추과의 후추(*Piper nigrum*), 국화과의 목향(*Aucklandia lappa*), 녹나무과의 계심(*Cinnamomum cassia*), 목련과의 대회향(*Illicium verum*), 마디풀과의 대황(*Theum coreanum*), 소나무과의 적송(*Pinus densiflora*) 등이 강한 감기 억제 활성을 나타내었는데(표 2), 이 중 국내 산림자원의 합리적인 이용을 위해 적송을 공시 식물체로 선정하고 활성성분을 분리, 동정한 결과 핵산층에서 dibutyl phthalate, 에틸아세테이트 획분에서 분리한 활성획분은 α -pinene으로 판명되었다(그림 4). 이들 활성본체와 적송에 함유된 기존의 6종 테르펜화합물 (hexadecane, β -caryophyllene, naphthalene, β -pinene, camphor, menthol)의 생쥐에 대한 감기 억제 활성을 비교한 결과(표 4), hexadecane이 가해부위 1곳, 총 가해 길이 1 mm로 가장 강한 감기억제활성을 보였고, 활성체인 dibutyl phthalate 및 α -pinene 은 각각 6곳, 12 mm와 5곳, 15 mm로 비교적 강한 활성을 나타내었다.

계심의 감기억제 활성 본체는 핵산층의 *trans*-cinnamaldehyde로 동정되어(그림 6) 기존에 알려진 식물체 유래 모노테르펜 화합물 (1,8-cineol, α -pinene, β -pinene, cinnamyl alcohol, menthol, geraniol, cinnamaldehyde, dipentene, linalool, eugenol, cuminaldehyde, cinnamic acid)의 활성 비교 실험에서 α -pinene, β -pinene, cinnamaldehyde 순으로 활성을 보였으며 그 효과는 15일간 지속되었다(표 5).

이상 식물체 기원성 쥐에 대한 기피활성을 갖는 화합물들에 대한 산업 응용성을 고려할 때 가장 응용도가 높다고 판단된 계심의 cinnamaldehyde의 돌연변이원성을 조사한 결과, 전자는 *S. typhimurium* TA-1535, TA-1537, TA-98 및 TA-100의 4개 시험균주에 대해 His⁻ → His⁺로의 복귀돌연변이를 유발하였으나, 후자는 돌연변이를 유발하지 않았다.

제 5 절 적 요

개발도상국의 경우 주요해충으로 인한 작물의 경제적 손실율은 5-50% 이거나 이보다 더 높다. 게다가 설치류는 농업과 산림에 막대한 손실을 일으키고, 통신시스템, 건축물 및 인간의 건강에 심각한 문제를 야기시키고 있다. 지난 수십년간 해충방제를 위한 다양한 노력들이 합성살충제의 개발을 통해 효율적인 방제를 위해 행해졌다. 비록 이들 합성살충제가 다양한 해충에 대해 효과적인 방제를 하였음에도 불구하고, 유기합성살충제의 연용 및 반복적인 사용이 천적에 대해 역효과를 유발했고 해충의 이상격발을 야기했으며 살충제와 살비제와 같은 여러 유형의 살충제에 대한 저항성의 발달, 유용생물에 대한 독성, 환경오염, 인간 보건 문제 등의 많은 문제들을 야기시켰다. 초기 유기합성 살충제들의 이러한 역효과에 대한 관심과 효율성의 저하는 새로운 유형의 선택적 방제제의 개발이나 기존 살충제의 사용 감소 및 비사용을 통해 작물보호를 하고자 하는 요구가 대두되었다.

식물체들은 많은 생활성 화합물들을 함유하고 있기 때문에 새로운 유형의 해충방제원이 될 수 있다. 특정 목적 해충을 포함한 제한적인 종들에 대해 활성을 가져왔고, 무독성 화합물로 생분해될 수 있으며 해충의 종합적 방제(IPM)를 위해 가장 적절하므로 이들은 새로운 계열의 보다 안전한 해충방제원의 개발을 가져올 수 있다. 따라서 더욱 많은 노력들이 상업적 살충제나 선도화합물로서 이용될 수 있을 식물체 산물들에 집중되고 있다.

본 연구는 국내 산림자원의 효율적인 관리와 약리학적 사고에 근간한 유용 한방식물체의 이용성 극대화 및 아열대산 식물체의 활용성 그리고 각종 미곡류와 콩과식물의 생리활성물질을 이용한 살충활성물질 및 기피활성, 섭식저해활성, 갇기억제활성을 갖는 물질을 탐색하여 관련 산업에 응용하고자 수행하였다.

1. 식물유래 살충제의 개발

한방식물 20종의 주요 유해생물 7종에 대한 살충활성 스크리닝 결과 버멸구의 경우, 은행나무잎에서 100%, 정향, 후추, 천궁, 울금에서 80% 이상의 살충율을 보였고, 배추좀나방에 대해서는 후추, 천궁, 울금이 80% 이상의 살충율을 보였다. 점박이용애에 대해서는 마에서 80 이상%의 살충율을 볼 수 있었다. 담배거세미나방과 복숭아혹진딧물에 대해서는 강한 살충활성을 나타내는 식물체는 없었다. 쌀바구미와 팔바구미의 경우, 처리 72시간 후에 15종 식물체들 중에서 목단피(모란의 뿌리 겹질), 정향 및 석창포가 쌀바구미에 대해서 살충활성을 나타내었으나, 15종 식물체 모두 팔바구미에 대해서는 어떤 활성도 나타내지 않았다..

국내산 식물 150종 식물체의 메탄올 조추출물의 주요 농업해충 5종에 대한 살충활성을 5000 ppm 농도로 처리하였을 때의 살충활성을 나타내었다. 버멸구의 경우 공시 식물체중에서 초피나무 수피, 편백 잎, 비목나무 잎 추출물에서 95%이상의 사충율을 나타내었다. 배추좀나방의 경우 초피나무 수피 추출물에서 70%의 사충율을 보였으나, 기타 식물체의 경우에는 거의 활성을 나타내지 않았다. 담배거세미나방의 경우 모든 식물체의 경우에는 거의 활성을 나타내지 않았다. 점박이용애의 경우 보리밥나무 잎, 광대싸리 잎 + 줄기, 두릅나무 잎, 초피나무 수피, 참가시나무 잎과 모새나무 잎 추출물에서 80% 이상 살비효과를 보였다.

제주도산 식물체 26종 살충호날성 스크리닝 결과, 버멸구에 대해 검은재나무, 곰의말채, 굴피나무, 말채나무, 백목련, 비자나무에서 80-90%의 살충활성이 관찰되었고, 배추좀나방에 대해서는 개벗나무, 검은재나무, 곰의말채, 괴물나무, 굴피나무, 까치박달, 담팔수, 돈나무, 때죽나무, 먼나무, 비자나무 등에서 70-80%의 살충활성이 보였으나, 역시 담배거세미나방에 대한 활성은 실험 식물체 모두에서 관찰할 수 없었다. 점박이용애의 경우에는 개벗나무, 검은재나무, 곰의말채, 괴물나무, 구실잣밤나무, 굴피나무, 다정큼나무, 담팔수, 돈나무, 때죽나무, 말채나무, 먼나무, 모람, 무환자나무, 백목련, 비자나무 등에서 70-80%의 살비활성을 나타내었다.

국내산 22종 미곡의 메탄올 추출물에 대한 벼멸구, 복숭아혹진딧물, 점박이용애에 대한 살충활성을 검정한 결과, 늘보리, 흑향미의 메탄올 추출물이 벼멸구에 대하여 강한 살충활성을 나타내었다. 복숭아혹진딧물의 경우, 메밀 메탄올 조추출물이 5000, 2500ppm에서 강한 살충활성을 나타내었다. 조, 기장, 밀, 쇠보리, 수수, 참깨, 흑향미 및 현미찰쌀의 메탄올 조추출물들은 점박이용애에 대하여 5,000 및 2,500ppm 농도에서 강한 살충활성을 보였다.

30과 49종 인도산 식물체의 84시료의 메탄올조추출물들이 미량국소처리법을 이용하여 벼멸구에 대해 살충활성을 조사하였다. 활성정도는 식물종 및 조직에 따라 다양하게 나타났다. 벼멸구 암컷 성충당 0.5 μ g의 약량에서 11종의 식물체들이 강한 살충활성을 보였다; *Adhatoda vasica* 잎(100%), *Annona squamosa* 종자(100%), *Nerium indicum* 줄기(100%), *Clerodendrum inerme* 식물체(90%), *Pongamia pinnata* 종자(95%), *Prosopis chinensis* 줄기(90%), *Vitex negundo* 잎(90%), *Azadirachta indica* 종자(89%)와 줄기(85%), *Aegle marmelos* 잎(88%)과 *Madhuca indica* 종유(88%). 그러나 *Annona squamosa* 종자 추출물이 암컷성충당 0.25 μ g에서도 100%의 살충력이 검정되었다. 천연물로서 이들 열대산 식물유래물질들이 벼멸구의 야외개체군 방제를 위한 유기합성살충제를 대체자로서 유용할 것 같다.

52종 국내식물체의 119시료와 49종 인도산 식물체 84시료의 메탄올추출물들이 분무법과 미량국소처리법을 이용해 벼멸구의 살충력이 검정되었는데, 이중 은행나무 잎이 가장 강력한 살충력을 보였다. 그 활성성분은 각종 기기분석을 통해 ginkgolides A, B, C와 bilobalide로 동정되었다. Bilobalide는 감수성 계통 벼멸구에 대해 기존에 사용되고 있는 유기합성 살충제인 carbofuran과 fenobucarb 보다 훨씬 더 강한 살충활성을 보였다. Bilobalide와 ginkgolides C는 암컷성충당 0.01 μ g 농도에서 마비중세와 신경떨림증상의 독성을 일으켜 30분 이내에 벼멸구를 죽게하였다. 이들 화합물들은 mice에 대해 무독(LD₅₀ > 1,000mg/kg)했고, 4종의 *Salmonella typhimurium* 계통에 대해 어떤 돌연변

이원성도 나타내지 않았다. 천연 살충제원으로서 은행나무잎 기원성 물질들이 여러종의 벼멸구와 매미충 방제를 위한 새로운 방제원으로서 유용할 것으로 여겨진다.

울금의 살충활성은 잎침지법을 이용하여 7종의 주요 해충에 대해 검정하였다. 활성 성분은 다양한 기기분석법을 통해 *ar-turmerone*으로 동정하였다. 이 화합물은 벼멸구와 배추좀나방에 대해 강한 살충활성을 보였을 뿐만 아니라, 밀녹병과 토마토역병에 대해서도 매우 높은 살균활성을 보였다. 4종의 *Salmonella typhimurium* 계통에 대한 돌연변이원성 조사에서 *ar-turmerone*은 돌연변이를 나타내었다. 이것은 천연물로서 식물병원균으로 유도되는 식물병과 다양한 해충들에 대한 새로운 방제원으로 이용될 수 있을 것이다.

2. 식물체 유래 곤충 섭식저해 및 기피활성 물질 개발

17과 45종 한방식물체들의 메탄올추출물이 잎침지법을 통해 배추좀나방과 담배거세미나방의 유충에 대해 섭식저해 및 기피활성이 조사되었다. 섭식저해활성은 곤충종 및 식물종에 따라 다른 양상을 보였다.

목단피는 쌀바구미와 팔바구미에 대해 조사 식물체중 가장 강한 살충 및 기피활성을 보였고, 정향은 쌀바구미에 대해 80%의 기피활성을 나타내었으나 기타 식물체들은 이런 기피활성을 보이지 않았다.

황련이 *Hyphantria cunea* 4령 유충과 *Agelastica coerulea* 성충에 대한 섭식저해활성을 잎침지법을 이용해 두종의 상업적으로 많이 사용되는 isoquinoline alkaloid인 *palmatine iodide*와 *coptisine chloride*를 비교실험하였다. 황련의 섭식저해성분은 다양한 기기분석을 통해 *berberine chloride*로 밝혀졌다. *H. cunea*의 경우, *palmatine iodide*와 *berberine chloride*를 1:1 (w/w) 비율로 혼합한 혼합물과 *palmatine iodide* (70%)와 *berberine chloride* (60%) 단독처리시와 비교했을 때, 500 ppm에서 단독처리 했을 때보다 높은 활성(100%)을 나타내었다. 또한, 250 ppm에서는 81%의 활성을 보였다. *A. coerulea* 성충의 경우, 125 ppm와 250 ppm에서 *berberine chloride*는 각각 55 %, 와

93 %의 섭식저해활성을 나타내었으나, 반면에 500 ppm에서 palmatine iodide와 coptisine chloride는 각각 35 %와 44 %의 비교적 약한 활성을 보였다. 이런 결과는 황련 유래물질들이 *H. cunea* 과 *A. coerulea*의 개체군 조절원으로서 이용될 수 있음을 암시한다.

정향의 *H. cunea* 과 *A. coerulea* 에 대한 섭식저해활성이 잎침지법을 이용해 조사되었다. 활성성분은 eugenol과 isoengenol이었다. 이들 화합물이 *H. cunea* 과 *A. coerulea*의 개체군 조절원으로서 이용될 수 있을 것으로 여겨진다.

하였는데, 이 식물체의 활성체는 알칼로이드계열의 berberine과 palmatine으로, 이들의 활성을 농도에 따라 조사한 결과 흰개미 및 배추좀나방 유충에 대해 berberine은 0.5 mg, 0.25 mg에서 흰개미에 대해 강한 저해활성을 보였고, palmatine의 경우 berberine에 비하여 약한 활성을 보였으며, 또한 berberine는 배추좀나방유충에 대해서도 125 ppm 농도에서 강한 섭식저해활성을 보였으나, palmatine는 전자에 비해 같은 농도에서 약한 활성을 보였다.

3. 쥐의 감기억제 활성성분의 개발

32과 54종의 메탄올추출물이 전선침지법을 이용해 쥐에 대한 감기억제활성이 조사되었다. 활성은 식물종 의존적이었다. 강한 감기억제활성은 후추과의 후추, 국화과의 목향, 녹나무과의 육계, 목련과의 대회향, 마디풀과의 대황, 소나무과의 적송에서 관찰되었다. 이들은 천연 쥐기피활성물질로서 이들 식물성 유래 물질들이 쥐에 의해 발생하는 많은 피해를 예방하는 저해자들로서 유용할 것으로 생각된다.

특히 계심과 적송의 감기억제활성 물질 분리를 위해 전선침지법을 이용해 실내사육 계통의 쥐에 대해 검정하였다. 계심의 활성성분은 cinnamaldehyde로 동정되었다. 이것의 활성이 4종(cinnamyl alcohol, *trans*-cinnamic acid, eugenol, salicylaldehyde)의 일반적으로 이용되고 있는 화합물들과 비교하였다. Cinnamaldehyde와 cinnamyl alcohol이 강한 감기억제활성을 보였고, 반면에 salicylaldehyde는 다소 약한 활성을 보였다.

중간정도의 활성은 *trans*-cinnamic과 eugenol에서 관찰되었다. Cinnamaldehyde와 cinnamyl alcohol의 2.5%와 5% 에탄올 수용액이 각각 중간정도와 강한 감기억제활성을 보였고, 반면에 1% 수용액에서는 약한 활성이 보였다. 적송의 활성성분은 각종 기분석법을 이용해 α -pinene과 dibutyl phthalate로 동정되었다. 이들 활성성분이 적송의 주요 함유 성분인 6종 테르펜화합물 (hexadecane, β -caryophyllene, naphthalene, β -pinene, camphor, menthol)과 생쥐에 대한 감기 억제 활성을 비교하였다. 비교 결과, hexadecane이 가장 강한 감기억제활성을 보였고, 분리한 dibutyl phthalate 및 α -pinene 은 비교적 강한 활성을 나타내었다. 한편 계심의 감기억제 활성 본체와 기존에 알려진 식물체 유래 모노테르펜 화합물 (1,8-cineol, α -pinene, β -pinene, cinnamyl alcohol, menthol, geraniol, cinnamaldehyde, dipentene, linalool, eugenol, cuminaldehyde, cinnamic acid)의 활성 비교 실험에서 α -pinene, β -pinene, cinnamaldehyde 순으로 활성을 보였고, 지속효과는 15일간 지속되었다. 결과적으로 계심과 적송이 쥐로 인해 발생하는 문제를 해결할 수 있는 방제원으로서 이용될 수 있을 것으로 생각된다.