

과제구분	기본연구	수행시기		전반기	
증장기 Code		RIMS Code			
연구과제 및 세부과제		연구분야 (Code)	수행기간	연구실	책임자
식물기원 농약대체 신물질 탐색		P02 BT5Z	'09~'10	농산물이용시험장	김희연
1) 식물기원 살초활성물질 분리연구		P02 BT5Z	'09~'10	농산물이용시험장	김희연
2) 농약대체 천연 살균활성 물질 분리연구		P02 BT5Z	'09~'10	농산물이용시험장	김희연
3) 천연물질을 이용한 느타리버섯 병해충 방제기술 개발연구		P02 BT5Z	'09~'10	농산물이용시험장	이광재
색인용어	가시박, 단풍잎돼지풀, 인삼병, 탕자나무, 버섯파리				

ABSTRACT

Plants produce many biologically active chemical compounds that inhibit the growth of other plants, microorganism and insects. In this study, methanol extracts and the fermented plant juice of herbicidal active of higher plant *Ailanthus altissima*, invasive naturalized plants *Sicyos angulatus* L. and *Ambrosia trifida* L. var. *trifida* were determined by bioassay using rape seed (*Brassica napus* L.) seedlings. As a result, all the activity was enhanced in fermented plant juice. We screened 92 species of Gangwon native plants by antibacterial activity of the extracts against *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Cylindrocarpon destructans*, *Alternaria panax*. As a result, *Agrimonia pilosa* Ledeb., *Pinus densiflora* Siebold & Zucc. and *Pinus densiflora* Siebold & Zucc. were selected. The field experiment results for *Botrytis cinerea* showed that 40% of the control. *Poncirus trifoliata* extracts were isolated insecticidal compound. The insecticidal activity of hexane extracts which is determined using *Lycoriella mali* was 65.6%. Activity-directed fraction of the extracts led to the identification of HQC as the insecticidal component. The chemical molecular weight of HQC is 594.

1. 연구목표

전세계적으로 인축 및 생태계에 많은 부작용을 야기하는 각종 유기합성 농약의 판매 사용금지로 인하여 이들을 신규화합물의 개발에 몰두하고 있다. 친환경 유기농산물의 수요가 급증하고 있고, 2008년 친환경농자재 시장 규모는 6,000억원을 넘었다. 유기합성을 통한 농약원제의 개발 가능성의 저하로 세계적으로는 환경친화적이고 인축 및 환경독성이 낮은 것으로 평가되는 식물 유래의 천연물 농약에 대한 관심이 증대되고 있는 상황이다. 그러나 세계적으로 식물체에서 의약관련 활성 성분들의 분리 및 동정에 대한 연구는 많이 진행되었지

만 농약활성에 대한 물질의 분리·동정 및 이를 이용한 신규 농약의 개발에 대한 체계적인 연구는 상대적으로 미미하다.

국내에는 185과 1,065속 4,596종의 식물이 서식하고 있는 것으로 알려져 있고, 식물에 함유된 생리활성물질은 친환경농업용 생화학 작물보호제 개발에 활용, 새로운 농약 개발을 위한 모화합물로 활용이 가능하다.

2. 재료 및 방법

<시험 1> 식물기원 살초활성 물질분리연구

가. 시료 채취

본 실험에 사용된 가죽나무(*Ailanthus altissima*), 가시박(*Sicyos angulatus* L.), 단풍잎돼지풀(*Ambrosia trifida* L. var. *trifida*) 시료는 자생지에서 채집하여 40°C에서 냉풍건조한 후 마쇄하여 사용하였다.

나. Methanol 추출물 조제

마쇄한 건조시료 100g을 취하여 MeOH 2 L가 담겨 있는 5-L erlenmeyer flask에 넣고 100 rpm의 진탕기에서 12시간씩 2회 반복추출하였다. MeOH 추출물을 여과지(No. 40, Whatman)가 깔려있는 Buchner funnel을 통과시켜 잔재물을 제거한 후 rotary vacuum evaporator(EYELA N-21NS)를 이용하여 50°C에서 완전 농축한 다음, d-H₂O를 50 ml 첨가하였다. Flask 내의 건조물을 d-H₂O를 이용하여 잘 용해시킨 다음 동결건조기(ILSHIN Lab Co. Ltd.)를 이용하여 건조하여 수율을 계산하였다.

다. 천혜녹즙 조제

본 실험에 사용된 가죽나무, 가시박, 단풍잎돼지풀 시료를 채집하여 설탕과 시료 생체를 1:2로 혼합 후, 15-20°C에서 10일간 숙성시킨 뒤 여과하여 사용하였다.

라. 살초활성검정

MeOH 추출물을 d-H₂O로 희석하여 10,000µg g⁻¹이 되게 stock solution을 제조하고, 이 stock solution으로부터 농도를 달리하는 처리액을 제조하였다. 처리액을 모래 1g 위에 5립의 유채 (*Brassica napus* L.) 종자가 치상되어 있는 24-well tissue culture plate에 처리하고, 이를 온도 25°C, 습도 70%, 광도 250 µmol m⁻² s⁻¹ 조건의 식물성장상에 놓고 성장시켰다. 처리 7일 후 유채의 생체중을 측정하여 각 시료에 대한 GR₅₀ 값(식물의 성장을 50% 저해할 수 있는 약량)을 구하였다.

<시험 2> 농약대체 천연살균 활성물질 분리 연구

가. 추출물 조제

본 실험에 사용한 시료는 채취 후 세척하였고, 동결건조(PVTFD10R, Ilshin, Korea)하여 사용하였다. 시료 추출 용매는 물과 에탄올을 사용하였다. 물 추출은 분말 시료 20g에 1차 증류수 200ml를 첨가하여 60°C에서 6시간 동안 초음파추출기(8510R-DTH, Branson, Danbury, USA)를 이용하여 2회 추출하였다. 추출물은 여과지(No. 2, Whatman, Maidstone, England)

가 깔려있는 Buchner funnel을 통과시켜 잔재물을 제거한 후 감압여과하여 rotary vacuum evaporator(N-21NS, EYELA, Tokyo, Japan)로 완전히 농축하였다. 농축이 완료된 후 건조물은 증류수 10ml를 첨가하여 용해시킨 후, 동결건조하여 -20℃의 냉동고에 보관하면서 사용하였다. 메탄올 추출은 분말 시료 20g에 메탄올 200 ml를 첨가하여 상온에서 120rpm의 진탕기에서 12시간 동안 2회 추출하였다. 농축 후 시료 제조 과정은 상기와 같다.

나. 항균 활성검정

1) 실내실험(Paper disc diffusion방법)

각각의 균(*Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Cylindrocarpon destructans*, *Alternaria panax*)을 Mueller Hinton agar plate에서 배양한 후, 단일 콜로니를 취하여 Mueller Hinton broth에 접종하고 37℃에서 12~15시간 배양한 다음 실험에 사용하였다. 균일한 농도로 조정된 각각의 세균배양액을 Mueller-Hinton agar 배지에 멸균 면봉을 이용하여 고르게 도말하고, 멸균된 paper disc를 배지 위에 일정한 간격으로 놓은 뒤, MeOH 추출물 시료를 50 μ l씩 disc에 접종하고, 37℃에서 24시간 배양하였다. 항균 효과는 배양 후 형성된 억제환(clear zone) 크기로 비교평가 결정하였다.

2) 포장실험

시험포지에서는 병원균 접종을 출아전인 4월 4일경, 약제 처리는 출아 후 줄기신장 생육이 대부분 완료된 4월 28일경에 하였다. 갈록병 접종을 위해 도정하지 않은 종자용 호밀을 조 등의 방법으로 배지를 준비하고 균주의 균총을 접종하여 25℃에서 25일간 배양한 것을 사용하였다. 1차 시험에서 갈록병균이 배양된 호밀 접종원을 건조하지 않은 상태로 4년생 시험포지 식재면적 30칸(1칸; 1.8m \times 0.9m=1.62m²)에 5kg을 처리하였다. 호밀 접종원은 처리 전, 칸 당 접종원 처리량 167g에 모래 2kg을 혼합하여 호밀 알갱이가 날개로 분리되도록 하여 시험포지 상면에 부초를 제거한 후 식재된 사이의 골 상면 흙을 5cm 정도 깊이로 파서 처리한 후 흙으로 다시 덮고 부초를 하였다. 처리액은 칸당 4리터씩 관주하였다.

<시험 3> 천연물질을 이용한 느타리버섯 병해충 방제기술 개발연구

가. MeOH 추출물

마쇄한 탱자나무 건조시료 100 g 을 취하여 MeOH 2 L가 담겨 있는 5-L erlenmeyer flask에 넣고 100rpm의 진탕기에서 12시간씩 2회 반복 추출하였다. MeOH 추출물을 여과지(No. 40, Whatman)가 깔려있는 Buchner funnel을 통과시켜 잔재물을 제거한 후 rotary vacuum evaporator(EYELA N-21NS)를 이용하여 50℃에서 완전 농축한 다음, d-H₂O를 50 ml 첨가하였다. Flask 내의 건조물질을 d-H₂O를 이용하여 잘 용해시킨 다음 동결건조기(ILSHIN Lab Co. Ltd.)를 이용하여 건조하여 수율을 계산하였다.

나. 살충활성 검정

긴수염파리는 본 시험장 버섯재배사에서 채집하여 사육하였다. 긴수염파리는 버섯균사가 배양된 톱밥 배지로 충진한 플라스틱상자(30 \times 30 \times 30cm)를 이용하여 실온에서 사육하였으며, 배지 내 수분조절을 위하여 하루 간격으로 수분을 보충하였다. 살충활성검정은 동결 건조한 추출물을 멸균수에 1%(w/v)의 농도로 녹인 후 버섯 균사가 배양된 균사덩어리(Φ 2.0 \times 3 cm)를 추출물에 30초

간 침지한 후 클린벤치 내에서 음건하여 곤충사육장(insect breeding square dish, 72×72×100 cm)에 넣었다. 곤충사육장에 긴수염파리 성충30마리씩을 접종하고 24시간, 48시간 후 죽은 개체를 조사하였다. 살충율 조사는 미세한 붓을 이용하여 몸통을 자극하여 움직임이 없는 개체를 사망한 것으로 간주하여 측정하였다.

다. MeOH 추출물의 용매 분획

MeOH 건조물 10g당 각각 100ml의 hexane, dichloromethane(MC), ethylacetate(EtOAc), butanol(BuOH), d-H₂O으로 단계적으로 용매의 극성을 높여가면서 각 용매의 가용분획별로 분획한 다음, 각각의 분획층을 rotary vacuum evaporator로 완전농축하고 동결건조시켰다.

라. 살충활성물질의 분리 및 정제

용매분획물 중 높은 살충활성을 나타낸 hexane 분획물을 preparative liquid chromatography system(Buchi labortechnik AG. Switzerland)를 사용하여 분리하였다. Silica gel이 충전되어 있는 49×460mm glass column(Buchi labortechnik AG. Switzerland)에 9 g 주입하여 Table 1에 나와 있는 용매 비율로 분당 20 ml씩 용출시켜 UV detector 254 nm에서 17개의 분획물(HA, HB, HC, HD, HE, HF, HG, HH, HI, HJ, HK, HL, HM, HN, HO, HP, HQ)을 얻었다(표 1).

표 1. 탱자나무 hexane의 분리 조건

용매 비율	시간(min)	분획물
solvent A; MC, solvent B; n-Hexane		
A : B (0:100)→ A : B (40:60)	45	HA
A : B (40:60)→ A : B (50:50)	15	HB
A : B (50:50)→ A : B (50:50)	15	HC
A : B (50:50)→ A : B (70:30)	15	HD
A : B (70:30)→ A : B (100:0)	45	HE
solvent A; MC, solvent B; EtOAc		
A : B (100:0)→ A : B (65:35)	45	HF
A : B (65:35)→ A : B (55:45)	10	HG
A : B (55:45)→ A : B (50:50)	5	HH
A : B (50:50)→ A : B (50:50)	10	HI
A : B (50:50)→ A : B (20:80)	30	HJ
A : B (20:80)→ A : B (0:100)	30	HK
solvent A; MeOH, solvent B; EtOAc		
A : B (0:100)→ A : B (40:60)	60	HL
A : B (40:60)→ A : B (50:50)	15	HM
A : B (50:50)→ A : B (60:40)	15	HN
A : B (60:40)→ A : B (70:30)	30	HO
A : B (70:30)→ A : B (100:0)	15	HP
B 100%	30	HQ

각각의 분획물을 rotary vacuum evaporator로 완전 농축한 다음, 버섯파리 살충활성검정을 실시하였다. 또한 17개의 분획물 중 높은 활성을 나타낸 HQ 분획물을 preparative liquid chromatography system(Buchi labortechnik AG, Switzerland)를 사용하여 분리하였다. ODS가 충전되어 있는 15×230 mm glass column(Buchi labortechnik AG, Switzerland)에 1g 주입하여 표 2에 나와 있는 용매 비율로 분당 3ml씩 용출시켜 UV detector 254nm에서 4개의 분획물(HQA, HQB, HQC, HQD)을 얻었다. 각각의 분획물을 앞서 기술한 방법에 따라 버섯파리 살충활성검정을 실시하였다.

표 2. HQ 층의 분리 조건

용매 비율	시간(min)	분획물
solvent A; H ₂ O, solvent B; ACN		
A : B (70:30)→ A : B (70:30)	7	HQA
A : B (70:30)→ A : B (70:30)	8	HQB
A : B (70:30)→ A : B (0:100)	45	HQC
solvent A; MeOH, solvent B; ACN		
A : B (0:100)→ A : B (100:0)	75	HQD

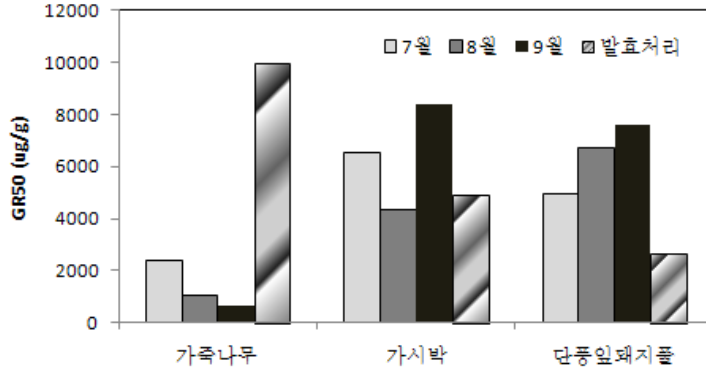
마. 살충활성물질의 기기분석

탱자나무로부터 분리한 살충활성물질 HQC의 화학구조를 구명하기 위하여 ¹H-NMR(600 MHz, Bruker Avance 600), ¹³C-NMR(600 MHz, Bruker Avance 600), Autopurification (prep-LC/MS, Waters)을 이용하여 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

<시험 1> 식물기원 살초활성 물질분리연구

가죽나무는 시기가 늦을수록 살초활성이 증가한 반면 가시박은 8월, 단풍잎돼지풀은 7월에 살초활성이 높았다. 8월에 가시박, 단풍잎돼지풀, 가죽나무를 수집하여 발효한 후, 살초활성을 검정한 결과, 가죽나무는 활성이 오히려 낮아졌으며, 가시박과 단풍잎돼지풀은 활성이 증가하였다(그림 1).



<그림 1> 시기별 MeOH 추출물과 발효처리 추출물의 살초활성

<시험 2> 농약대체 천연살균 활성물질 분리 연구

강원도 자생식물 92종을 물과 메탄올로 추출 후 인삼병해균 4종에 대한 항균활성을 검정한 결과(표 3), 짚신나물 뿌리, 소나무, 관중 메탄올 추출물의 활성이 높게 나타났다. 짚신나물 뿌리 메탄올 추출물은 잣빛곰팡이병에 효과가 높았으며 소나무 메탄올 추출물은 잣빛곰팡이와 점무늬병, 관중 메탄올 추출물은 잣빛곰팡이병 효과가 높았다.

표 3. 인삼병해균 4종에 대한 조추출물(10 mg/ml)의 항균활성 효과

병원균	항균력(mm/5 days)			
	<i>R. solani</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>C. destructans</i>	<i>A. panax</i>
짚신나물(뿌리)	+++++ (>5 mm)	+++++ (>5 mm)	-	-
소나무	-	+ (0.5 mm)	-	++ (2 mm)
관중	++++ (4 mm)	+++++ (5 mm)	-	-

92종 식물 추출물의 *In vitro* 살균활성검정으로 선발된 짚신나물(뿌리), 소나무, 관중 메탄올 추출물의 *Botrytis cinerea*(잣빛곰팡이병) 대상으로 포장실험을 수행하였다(표 4). 짚신나물(뿌리), 소나무, 관중 메탄올 추출물 처리 모두 40% 정도의 방제효과와 생육증진효과가 나타났으나, 방제 편차가 컸다.

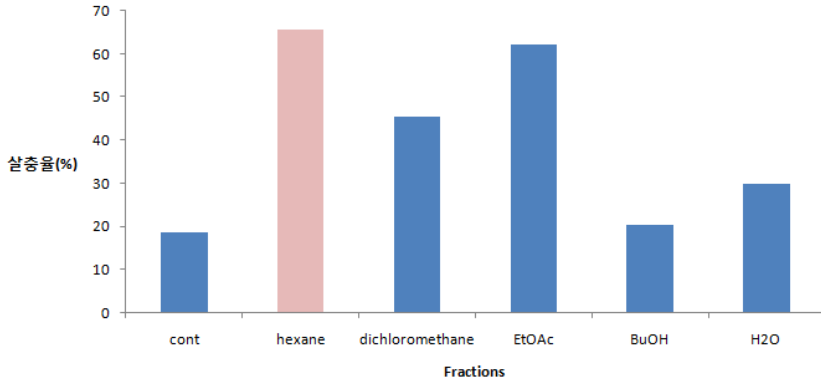
표 4. 잣빛곰팡이병 대상 조추출물(10 mg/ml)의 항균활성 효과(포장시험)

약제명	짚신나물(뿌리)	소나무	관중	대조	대조 (사파이어)
방제가	40.0±26.1	41.7±28.2	36.7±25.1	16.7±8.9	85.0±5.2

<시험 3> 천연물질을 이용한 느타리버섯 병해충 방제기술 개발연구

탱자나무 MeOH 추출물을 극성을 달리하는 hexane, dichloromethane, EtOAc, BuOH, d-H₂O 로 분획하고, 각각의 분획물을 농축건조시킨 다음, 버섯파리 살충활성을 검정한 결과, hexane,

dichloromethane, EtOAc, BuOH, d-H₂O 분획물의 살충율은 각각 65.6%(회수율 11.5%), 45.3%(회수율 5.7%), 62.2%(회수율 6.6%), 20.3%(회수율 28.8%), 29.7%(회수율 47.4%)이었다(그림 2).



<그림 2> 탕자나무 용매분획층(10 mg/ml)의 살충율

높은 살충활성을 나타낸 hexane 분획물을 표 1에 나와 있는 용매 비율로 순차적으로 용출시켜 17개의 분획물(HA, HB, HC, HD, HE, HF, HG, HH, HI, HJ, HK, HL, HM, HN, HO, HP, HQ)을 얻고 살충활성을 검정한 결과는 다음과 같다(표 5). 1mg/ml의 농도로 처리한 HQ 분획층의 살충율이 45.9%로 가장 높았다.

표 5. 탕자나무 hexane 분획물(1 mg/ml)의 살충율

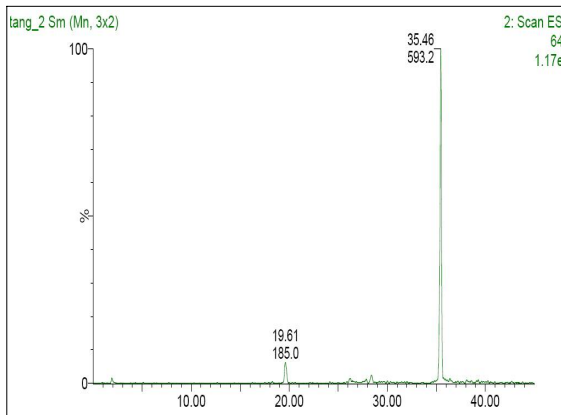
분획물	치사율(%)	수율(mg)
대조구	14.4	-
HA	-	251
HB	18.7	1015
HC	16.7	258
HD	16.7	201
HE	35.7	455
HF	33.3	12
HG	35.7	864
HH	25.1	110
HI	-	3
HJ	40.0	80
HK	30.0	28
HL	-	9
HM	41.2	21
HN	21.4	65
HO	-	510
HP	41.2	455
HQ	45.9	294

높은 살충활성을 나타낸 HQ 분획물을 표 2에 나와 있는 용매 비율로 순차적으로 용출시켜 4개의 분획물(HQA, HQB, HQC, HQD)을 얻고 살충활성을 검정한 결과는 다음과 같다(표 6). 1mg/ml의 농도로 처리한 HQC 분획층의 살충율이 45.9%로 가장 높았다.

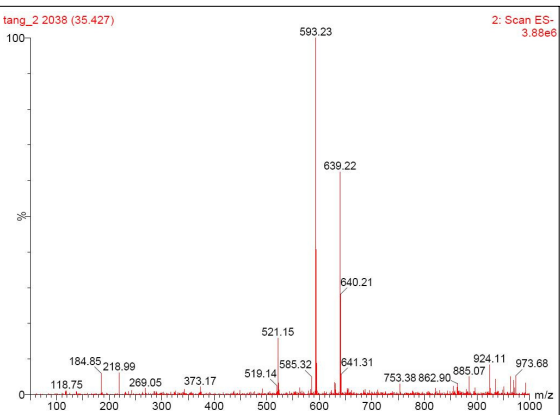
표 6. 탱자나무 HQ 분획물(1mg/ml)의 살충율

분획물	치사율(%)	수율(mg)
대조구	6.7	-
HQA	-	57
HQB	27.2	66
HQC	50.3	22
HQD	-	26

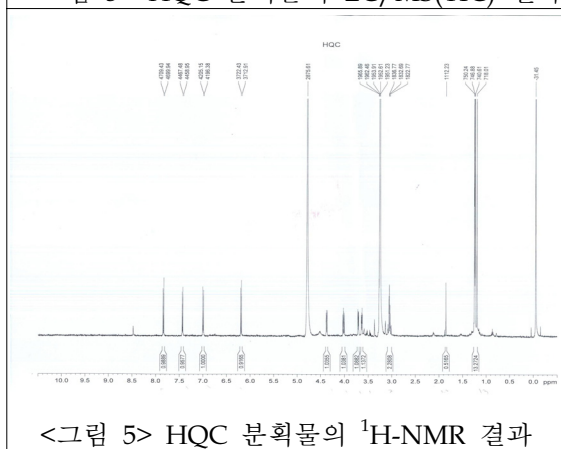
HQC 분획물의 구조동정을 위하여 LC/MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 분석한 결과 594의 분자량을 갖는 물질로 추정된다(그림 3, 4, 5, 6).



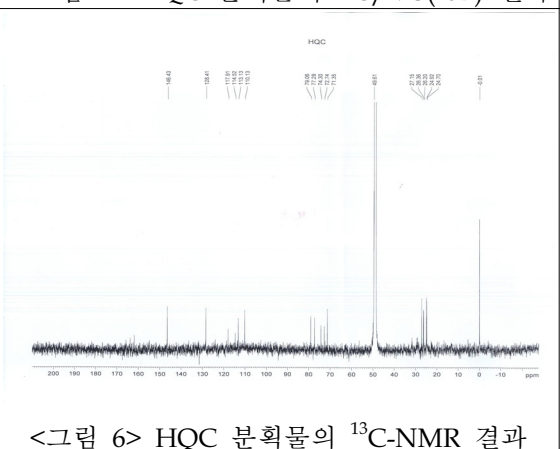
<그림 3> HQC 분획물의 LC/MS(TIC) 결과



<그림 4> HQC 분획물의 LC/MS(Ion) 결과



<그림 5> HQC 분획물의 ¹H-NMR 결과



<그림 6> HQC 분획물의 ¹³C-NMR 결과

4. 적 요

<시험 1> 식물기원 살초활성물질 분리연구

살초활성이 높은 가죽나무와 생태계위해잡초인 가시박과 단풍잎돼지풀의 제초제 대응활용 방안을 탐색하기 위해 메탄올 용매 추출물과 천혜녹즙 추출물의 활성을 검정한 결과 가시박과 단풍잎돼지풀 모두 천혜녹즙 추출물에서 활성이 증진되었다.

<시험 2> 농약대체 천연 살균활성 물질 분리연구

강원도 자원식물 92종의 물과 메탄올 추출물을 인삼병해균 4종을 대상으로 실내실험을 검정한 결과, 쫄신나물(뿌리), 소나무, 관중 메탄올 추출물이 선발되었다. 잣빛곰팡이병을 대상으로 포장실험결과 40%의 방제가를 나타냈다.

<시험 3> 천연물질을 이용한 느타리버섯 병해충 방제기술 개발연구

버섯파리류인 긴수염파리에 대한 높은 활성으로 선발된 탱자나무 메탄올 추출물을 대상으로 살충활성물질을 분리한 결과, HQC 분획물로 최종 분리되었으며, 분자량 594의 화합물로 추정된다.

5. 인용문헌

- 김성문, 김미성, 이유선, 김희연, 최해진, 허수정, 권순배, 김경희, 한상섭, 임상현. 2005. 살초활성물질 함유 국내 자생식물의 탐색 (III). 농약과학회지 9(2): 173~180.
- 김성문, 허수정, 용석호, 김진석, 허장현. 2001. 천연물기원 살초활성물질. 한국잡초학회지 21(3): 199~290.
- 김희연, 최해진, 임상현, 허수정, 한상섭, 김도순, 황기환, 김성문. 2003. 살초활성물질 함유 국내 자생식물의 탐색 (I). 농약과학회지 7(4): 248~257.
- 서울대학교. 2006. 저독성 선택독성의 식물체 기원 버섯파리 방제제 개발 연구보고서. 농림부.
- 이광재, 김경희, 박영학, 허남기, 김성문, 박동식. 2008. 탱자나무 추출물을 포함하는 살충용 조성물. 대한민국특허 10-0822767.
- 조대휘, 유연현. 2005. 인삼잘록병 발생억제에 미치는 Fludioxonil, Flutolanil 및 Thifluzamide의 효과. 고려인삼학회지. 29(4): 185-191.
- 한승호, 우나리아, 이송득, 강명화. 2006. 국내 자생식물 추출물의 항산화 활성 및 항균효과. 한국약용작물학회. 14(1): 49-55.

6. 연구결과 활용

연도 (연차)	활용구분	제 목
2010년도 (2년차)	특허출원	탱자나무로부터 살충활성물질의 분리

7. 연구원 편성

구분	소속	직급	성명	수행업무	참여년도	
					09	10
책임자	농산물이용시험장	지방농업연구사	김희연	과제총괄	○	○
공동 연구자	"	지방농업연구관	김경희	연구자문	○	○
	"	지방농업연구사	임상현	시료수집	○	○
	"	"	이광재	활성검정	○	○
연구 보조원	"	연구원	박유화	물질분리	○	○
	"	"	함헌주	물질분리	○	○
	"	"	이기연	시료추출	○	○