

## 방선균 분리주 No. 11660이 생산하는 살충성 물질 구조 동정

오세량\* · 이형규 · 최수근 · 김정일  
KIST 유전공학연구소 응용미생물 연구그룹

### Identification of Insecticidal Compounds from *Actinomycetes* Isolate No. 1166

Oh, Sei-Ryang\*, Hyeong-Kyu Lee, Soo-Keun Choi and Jeong-Il Kim

Applied Microbiology Research Group, Genetic Engineering Research Institute,  
KIST, P.O.Box 115, Taedok Science Town 305-600, Taejeon, Korea

**Abstract** — In the course of screening for insecticidal metabolites from soil microorganisms, *Actinomycetes* isolate no.1166 was found to produce active metabolites against *Musca domestica* and *Bombyx mori*. Three active components from the metabolites were isolated by solvent extraction and chromatographic techniques and examined their insecticidal activities on *Bombyx mori* (3rd larvae) by diet feeding bioassay methods. By UV and NMR data analyses, compound I and III were identified as bafilomycin A<sub>2</sub> and B<sub>1</sub>, respectively and compound II was also estimated to belong to the bafilomycin family from its physico-chemical data and biological properties.

오늘날 사용되고 있는 유기합성 살충제들은 약효의 증가문제와 함께 부작용을 줄이려는 방향으로 개발되어 왔지만, 그 작용기작이 본질적으로 비선택적인 몇가지의 선도물질로부터 출발된 것이므로 인축을 포함한 non-target 생물들에 대한 독성문제를 극복하지 못하고 있으며, 공통적인 구조와 작용기작으로 방제대상 생물에 저항성을 유발하여 계속 사용하면 사용량을 증가해야만 하였다. 이로 말미암아 인축에 대한 직접적인 독성문제 뿐만 아니라, 대량 사용시 환경중에서 먹이사슬 균형을 포함한 생태계 전반의 안정을 위협하는 주된 원인중의 하나로 인식되어, 사용범위에 대한 규제가 더욱 엄격해지고 있는 실정이다. 따라서 최근에는 기존 살충제들의 비선택적인 독성으로 야기되는 단점들을 극복하고 대체할 수 있는 새로운 작용기작, 새로운 구조의 선도물질을 다양한 생물 자원으로부터 개발하려는 연구가 진행되고 있다(1-14).

새로운 물질의 자원으로서는 토양 미생물중 방선균은 수많은 생물학적 활성을 갖는 이차 대사산물을 생산하여 1930년대 이후 수천의 항생물질들이 방선균으로부터 개발되어(15) 왔기 때문에 새로운 구조의 살

충성 물질 개발을 위한 신물질 연구도 주로 방선균의 이차 대사산물을 대상으로 연구되고 있으며, 연구초기에는 기존의 항생물질을 대상으로 살충활성을 조사하는 정도였으나, 70년대에 tetranactin(16)이 살충성 물질로서 발견되어 처음으로 살충제로 개발된 이래, avermectins(17), milbemycins(18) 등의 신물질들이 살충제로서 개발되었거나 그 과정중에 있다.

본 연구실에서는 새로운 구조의 살충성 물질 선발을 목적으로 우리나라 각 지역의 토양으로부터 방선균 7,105 균주를 분리하였으며, 이들을 대상으로 살충활성이 있는 균주를 선별하고 살충성 물질을 분리하는 연구를 수행하여 왔다. 그 중 no. 1166 균주가 생산하는 살충성 물질이 분리, 동정되었기에 이를 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 방선균의 분리 및 배양

우리나라 전역의 토양을 대상으로 농가부식토, 산림퇴적물, 각종농지 등 다양한 토양환경으로부터 시료를 채취하였다. 방선균의 분리는 Nonomura 등(19)의 방법을 사용하여 0.05% SDS와 6% yeast extract 용액에서 전처리를 하고, cycloheximide 50 ppm과 nalidixic acid 20 ppm이 첨가된 방선균 분리용 배지

**Key words:** *Actinomycetes* sp. no. 1166, bafilomycins

\*Corresponding author

(soluble starch 1%, casein 0.03%, KNO<sub>3</sub> 0.2%, NaCl 0.2%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2%, CaCO<sub>3</sub> 0.002%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.005%, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001%, agar 1.5%, pH 7.3)에서 배양(30°C, 7 days)하여 방선균이 선택적으로 배양되도록 하였다. 배양된 방선균들의 colony 들은 GAPY 배지(glucose 1.0%, soluble starch 2.0%, bacto soy-tone 0.5%, yeast extract 0.5%, CaCO<sub>3</sub> 0.1%, agar 1.5%, pH 7.2)에서 순수 분리하였으며, 분리된 균주들은 동일 배지상에서 4°C로 보관하면서 배양에 사용하였다.

**1차 살충성 검정**

분리 방선균의 1차 살충성 검정은 Fabre 등(20)의 방법을 참고하여 집파리(*Musca domestica*)를 대상으로 실시하였다. 검정방법은 GAPY 고체 배지에서 7~10일간 배양된 균체를 포함하는 agar를 1/2로 나눈 후, 각각에 용화직전의 유충을 10마리씩 넣고 4일 후 사충율을 조사하였으며, 아울러 7일 후 유충의 용화 및 우화율을 조사하였다.

**2차 살충성 검정**

GAPY 액체 배지 50 ml에 분리균주를 1백금이 접종하여 진탕배양기에서 28°C, 7일간 배양하였다. 배양액은 원심분리(5,000 rpm, 3 min.)하여 균체외 배양상등액으로 분리하고 균체는 acetone 50 ml를 가하여 30분간 진탕한 후 여과하여 감압 농축하였고, 배양상등액은 ethylacetate로 추출하여 감압 농축한 후 각각의 추출액을 검정에 사용하였다. 검정방법은, 집누에 나방(*Bombyx mori*) 유충 3령 10마리가 포집된 처리구에 본 실험실에서 제조한 인공사료를 넣고 사료 위에 일정량의 추출액을 가하는 방법을 사용하였으며 24시간 후 사충율을 조사하였다. 그리고 각 추출액을 순상 TLC(silica gel 60F<sub>254</sub>, chloroform-ethylacetate-methanol 5/4/1, v/v/v) 상에서 전개한 후, 분리되는 모든 물질들을 동일한 방법으로 살충검정을 하여 살충성 물질들의 TLC 전개상의 위치를 확인하였으며, 이를 기준으로 물질의 분리를 시도하였다.

**항균력 검정**

항균력 검정은, *Escherichia coli* BE 1186, *Salmonella typhimurium* SL 1102, *Pseudomonas auroginosa* IFO 13130, *Bacillus subtilis* IFO 3513, *Staphylococcus aureus* R-209, *Candida albicans* IFO 1594 등 6가지 미생물을 대상으로 실시하였다. 검정방법은 피검균을 접종한 검정용 평판 배지를 제작한 후, 분리된 각 살충성 물질들을 검정용 배지에 놓인 paper disc에

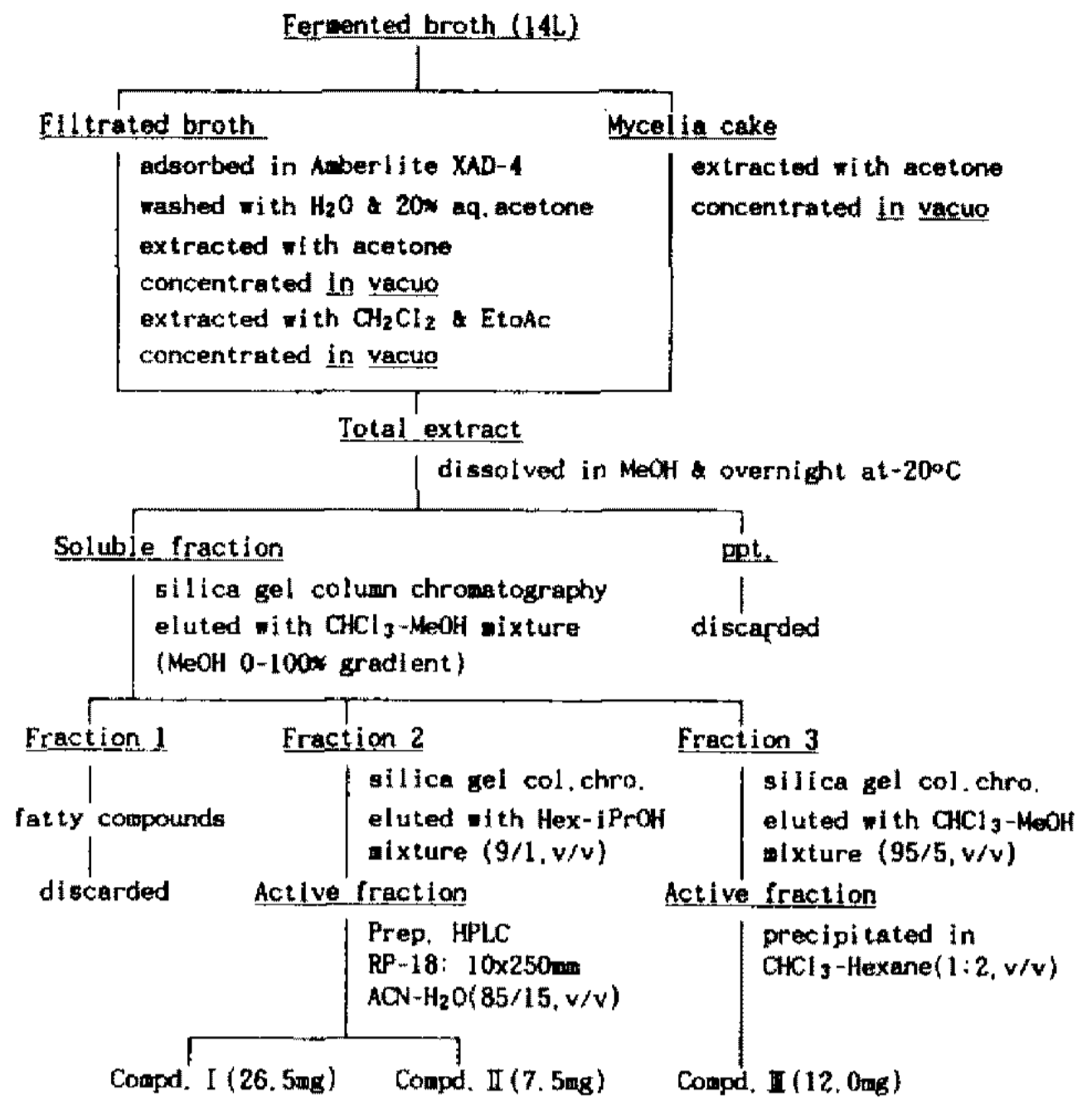


Fig. 1. Isolation procedure of insecticidal compounds from *Actinomycetes* isolate no. 1166.

20 µg 씩 처리한 뒤, 30~37°C 항온기에서 배양하여 24시간 후 나타나는 생육저지환의 유무로 항균력을 판정하였다.

**균주 배양 및 살충성 물질 분리**

No. 1166 균주의 배양은 먼저 GAPY 액체배지 500 ml에 분리균주를 접종하고 진탕배양기에서 종배양(27°C, 220 rpm, 3 days) 한 후, 이를 동일 배지 14l에 접종하여 본배양(27°C, 220 rpm, 7 days)을 하였다. 균주의 배양 후 살충성 물질들을 분리한 과정은 Fig. 1과 같다. 살충성 물질들은 균체 및 배양 상등액에 모두 존재하였으며, 유기용매로 추출이 가능하여 각각을 분리하여 추출을 한 후 함께 모았다. 총 추출액은 silica gel 300 g이 충전된 column(φ5×50 cm) 상에서 chloroform-methanol mixture(methanol 0~100% gradient)를 사용하여 극성을 높여가며 용출하였으며, 용출액은 TLC 결과와 bioassay의 결과에 따라 3개의 분획으로 구분하였다. 그중 Fraction 2의 살충성 물질들은 Lobar column(silica gel φ42×440 mm) 상에서 hexane-isopropanol mixture(9/1, v/v)를 사용하여 분리한 후, 최종적으로 HPLC(LiChrosorb RP-18, φ10×250 mm, ACN-H<sub>2</sub>O 85/15, v/v) 상에서 정제를 하였다. Fraction 3의 살충성 물질은 column(φ5×50 cm) 상에서 chloroform-methanol(95/5, v/v)를 사용하여 분리한 후, chloroform-hexane mixture(1/2, v/v)에서 침전법으로 정제를 시도하였다.

### 사용 기기

물질 분리정제에 사용한 HPLC는 Spectra-Physics Co.의 SP8800으로, FOCUS detector(forward optical scanning detector)로 검출하였다. UV/Vis. absorption spectrum은 Milton Roy Co.의 Spectronic 3000 array를 사용하여 측정하였으며, NMR spectrum은 Varian UNITY 500을 사용하여 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 살충 및 항균활성

No. 1166 균주의 고체 배양체를 직접 집파리 유충에 처리한 1차 살충성 검정에서, 48시간 이내에 100% 살충효과가 재현성 있게 나타나, 본 균주의 살충성 물질 생산은 안정한 것으로 확인하였다. 그리고 대량 배양 후 분리된 살충성 물질 compound I, II 및 III의 살충활성을 검정한 결과, compound I과 II는 본 실험조건에서 12.5 µg 수준에서 100% 살충효과를 보여 오 등(21)이 보고한 piericidins나 유기합성 살충제인 DDT와 parathion의 살충효과와 동일한 수준이었으며, compound III은 50 µg 수준에서 100% 살충효과를 나타내었다(Table 1). 그리고, 이들의 항균활성을 paper disc 방법으로 검정한 결과, compound I과 II는 사용된 피검균 6가지에 모두 항균활성을 나타내지 않았으며 compound III은 *Bacillus subtilis* 1021에 항균효과를 나타내었다(Table 2).

### 구조 동정

Compound I, II 그리고 III의 분리정제 후 몇가지 이화학적 특성을 보면 Table 3과 같다. UV spectrum pattern은 모두 동일하였으며 최대 흡수 파장이 245 nm와 282 nm이었다(Fig. 2).

분리된 물질들의 항균 및 살충 활성 결과와 UV spectrum pattern 및 TLC 발색결과 등 이화학적 특성을 토대로 기존의 살충성 물질 및 항생물질과 비교 검색한 결과, macrolide 계열 물질중 Werner 등(22)이 보고한 bafilomycins의 특징들과 매우 유사하였다. Bafilomycin 계열 물질들로는 A<sub>1</sub>(23), B<sub>1</sub>(setamycin)(24), C<sub>1</sub>(L-681,110 A<sub>1</sub>)(25), D 및 E(26)와 A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, 및 C<sub>1</sub>의 구조중 19번 위치의 hydroxyl group이 methylation된 A<sub>2</sub>, B<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>(L-681,110 A<sub>2</sub>)가 있으며, 그외에 leucanicidin(27), L-155,175(28), Hygrolidin(29) 등이 다양한 assay system에서 분리, 보고되었는데, 이들은 모두 동일한 lactone ring의 골격을 가지고 있으나 구조중 2번, 19번, 21번 위치 등에 결합된 치환기에 따라 살충, 항균 및 항암활성 등 생리활성이 매우 다르게 나타나고 있다. 따라서, 본 살충성 물질들이 UV spectrum 등 이화학적 특성이 유사하면서도 살충 및 항균활성이 다르게 나타나는 점으로 보아 bafilomycins 계열 물질들로 추정되었으며, 각 물질들은 NMR을 사용하여 정확한 구조 동정을 시도하였다(Table 4).

Compound I은, <sup>13</sup>C-NMR에서 총 36개의 탄소가 검출되었으며, DEPT로 탄소특성을 조사한 결과, 9개의 CH<sub>3</sub>, 2개의 CH<sub>2</sub>, 15개의 CH 및 7개의 4급 탄소(1개의 carbonyl group 포함)등 33개의 골격 탄소와

Table 1. Insecticidal activity of Compound I, II and III from *Actinomyces* sp. no. 1166

	100 µg <sup>1)</sup>	50 µg	25 µg	12.5 µg	6.25 µg	3.12 µg	1.6 µg
Compound I	—	—	—	10/10 <sup>2)</sup>	9/10	6/10	2/10
Compound II	—	—	—	10/10	9/10	1/10	0/10
Compound III	10/10	10/10	5/10	0/10	—	—	—

<sup>1)</sup>loading dosage of compound on artificial diet 1.0 g.

<sup>2)</sup>no. of dead larvae/applied larvae (3rd larvae of *Bombyx mori*) after 24 hrs.

Table 2. Antimicrobial activity of Compound I, II and III from *Actinomyces* sp. no. 1166\*

Organism	Compound I	Compound II	Compound III
<i>Esherichia coli</i> BE 1186	—	—	—
<i>Salmonella typhimuriuma</i> SL 1102	—	—	—
<i>Pseudomonas auroginosa</i> IFO 13130	—	—	—
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 3513	—	—	+
<i>Staphylococcus aureus</i> R-209	—	—	—
<i>Candida albicans</i> IFO 1594	—	—	+/-

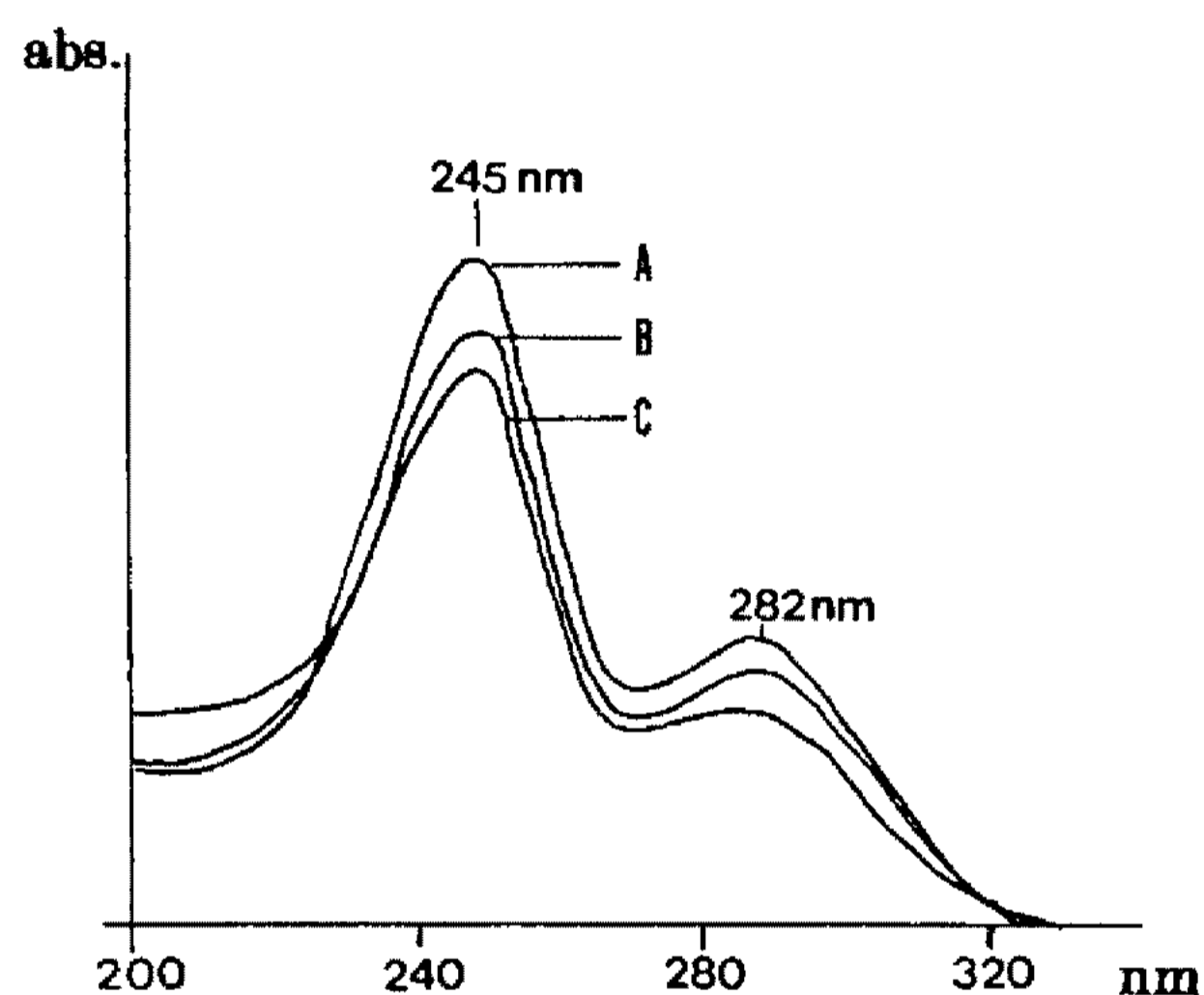
\*loading disage: 20 µg/disc, paper disc method.

**Table 3. Physico-chemical properties of compound I, II and III from *Actinomyces* sp. no. 1166**

	Compound I	Compound II	Compound III
Nature	white powder	white powder	yellow powder
TLC Rf. value normal phase <sup>1)</sup>	0.82	0.77	0.51
reversed phase <sup>2)</sup>	0.35	0.33	0.25
UV $\lambda$ MeOH max	245, 282 nm		
Solubility soluble insoluble	methanol, acetone, ethylacetate, chloroform hexane, H <sub>2</sub> O		
Color reaction positive Color reaction negative	anisaldehyde-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , I <sub>2</sub> vapor, 18% methanolic HCl ninhydrin, dragendoff's reagent		

<sup>1)</sup>precoated silica gel 60F<sub>254</sub> (Merck), solvent system; chloroform/ethylacetate/methanol (5/4/1, v/v/v).

<sup>2)</sup>precoated RP-18 60F<sub>254</sub> (Whatman), solvent system; methanol/H<sub>2</sub>O (9/1, v/v).



**Fig. 2. UV spectra of isolated compounds from *Actinomyces* isolate no. 1166 in methanol.**

A: compound I, B: compound II, C: compound III

3개의 OCH<sub>3</sub> group이 나타났다. 그리고, <sup>1</sup>H-NMR에서도 2개의 singlet CH<sub>3</sub>, 7개의 doublet CH<sub>3</sub>, 3개의 OCH<sub>3</sub>가 나타났다. Bafilomycins 계열 물질들이 구분되는 구조적인 특징을 NMR spectrum에서 비교해보면, 탄소 21번 위치의 proton 및 carbon의 NMR signal이 bafilomycin A<sub>1</sub>에서는 각각 3.69 ppm, 70.8 ppm으로 나타나는데 비하여, bafilomycin B 계열 물질인 L-155,175 I, II 및 setamycin은 이 위치의 hydroxyl group이 flavensomycinic acid의 ester로 치환되어 있어서 각각 5.89 ppm, 73.3~76.8 ppm으로, bafilomycin C 계열 물질인 L-681,110 A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>와 hygrolidin은 fumaryl ester group으로 치환되어 있어서, 각

각 5.01~5.05 ppm, 76.1~76.7 ppm으로 downfield shift되어 나타나며, bafilomycin D나 E는 19번 탄소 이하 pyran ring이 개열되어 이 위치에서의 downfield shift 뿐만 아니라 19번 탄소가 carbonyl group의 signal로 나타나는 등 proton 및 carbon data가 상기한 계열 물질들과 매우 다르게 나타난다. 따라서, 본 물질이 21번 탄소 위치에서 proton이 3.59 ppm, carbon이 71.3 ppm으로 나타난 점과 전체적인 탄소의 수 및 이들의 NMR signal들이 bafilomycin A<sub>1</sub>과 잘 일치하여 bafilomycin A 계열 물질로 추정되었다. 그리고, Hatfield 등(30)은 bafilomycin A 계열 물질중 A<sub>1</sub>은 methanol 용매 하에서 19번 위치의 hydroxyl group이 쉽게 methylketal화 되어 A<sub>2</sub>를 생성한다고 보고하였는데, 본 물질에서 나타난 3개의 OCH<sub>3</sub> 중 2개는 lactone ring의 2번과 14번 탄소 위치에 결합하는 것이 bafilomycin A<sub>1</sub>의 NMR data와 일치하였으므로, 나머지 하나의 OCH<sub>3</sub>가 19번 탄소 위치에 존재할 것으로 생각되었으며, <sup>13</sup>C-NMR에서 19번 탄소의 signal이 103.7 ppm으로 bafilomycin A<sub>1</sub>의 99.0 ppm보다 downfield shift된 것이 인정되어 본 화합물을 bafilomycin A<sub>2</sub>로 동정하였다(Fig. 3).

Compound III는 미황색의 무정형 물질로서 UV spectrum 및 NMR data가 compound I과 매우 유사하였다. 그러나, <sup>13</sup>C-NMR 상에서 2개의 OCH<sub>3</sub>(56.2 ppm, 60.9 ppm)만 나타나고 19번 위치의 <sup>13</sup>C-NMR signal이 99.5 ppm으로서 compound I에 비해 upfield shift되어 나타나므로 이 위치에 methyl 치환기가 없다는 것을 알 수 있고, <sup>1</sup>H-NMR에서 7.17(d, J=15.2 Hz), 6.93(d, J=15.2 Hz), 2.65(4H, m) 및 8.33

Table 4.  $^{13}\text{C}$ -NMR chemical shift ( $\delta$ , ppm) data of compound I and compound III from *Actinomyces* sp. no. 1166<sup>1)</sup>

Carbon no.	Compound I	Bafilomycin A <sup>2)</sup>	Compound III	Setamycin <sup>3)</sup>
1	167.3(C) <sup>4)</sup>	167.3	167.4	167.3
2	142.2(C)	141.1	142.2	141.2
2-OCH <sub>3</sub>	60.8	59.9	60.9	59.9
3	133.7(CH)	133.7	134.3	133.4
4	133.5(C)	132.8	133.6	133.3
5	143.3(CH)	143.3	143.4	143.0
6	37.4(CH)	36.8	37.4	36.7
7	82.0(CH)	80.0	82.0	81.2
8	39.2(CH)	40.2	38.2	37.1
9	42.0(CH <sub>2</sub> )	41.3	41.9	41.2
10	143.4(C)	143.4	143.7	142.8
11	126.1(CH)	125.0	133.4	133.0
12	133.3(CH)	133.2	126.1	125.0
13	128.2(CH)	126.8	128.1	127.1
14	83.5(CH)	82.3	70.2	70.6
14-OCH <sub>3</sub>	56.2	55.5	56.2	55.5
15	77.8(CH)	76.8	77.5	77.2
16	39.6(CH)	37.2	38.9	38.2
17	70.3(CH)	70.6	83.4	82.2
18	40.9(CH)	42.1	42.1	42.0
19	103.7(C)	99.0	99.5	98.8
19-OCH <sub>3</sub>	47.2	—	—	—
20	39.7(CH <sub>2</sub> )	43.5	40.5	40.0
21	71.3(CH)	70.7	76.2	76.8
22	40.5(CH)	40.9	40.7	40.0
23	71.5(CH)	75.9	75.9	75.5
24	29.0(CH)	27.9	28.6	27.9
25	21.4(CH <sub>3</sub> )	21.2	13.0	12.3
26	14.7(CH <sub>3</sub> )	14.0	8.1	7.1
27	17.9(CH <sub>3</sub> )	17.3	14.7	14.0
28	22.5(CH <sub>3</sub> )	21.7	18.0	17.3
29	20.7(CH <sub>3</sub> )	20.2	11.4	9.8
30	11.4(CH <sub>3</sub> )	9.8	20.8	20.2
31	8.1(CH <sub>3</sub> )	7.1	22.4	21.6
32	12.8(CH <sub>3</sub> )	12.2	14.8	14.3
33	14.9(CH <sub>3</sub> )	14.3	20.9	21.0
1'			165.0(C)	164.3
2'			133.7(CH)	133.6
3'			134.2(CH)	133.0
4'			164.3(C)	163.6
5'			115.4(C)	114.9
6'			175.4(C)	175.2
7'			26.4(CH <sub>2</sub> )	25.8
8'			32.8(CH <sub>2</sub> )	32.2
9'			198.1(C)	197.7

<sup>1)</sup> measured in CDCl<sub>3</sub> at 125 MHz with TMS as an internal standard, <sup>2)</sup> data from G.H. Baker's paper<sup>(23)</sup>, <sup>3)</sup> data from K. Otaguro's paper<sup>(24)</sup>, <sup>4)</sup> each carbon character was determined by DEPT.

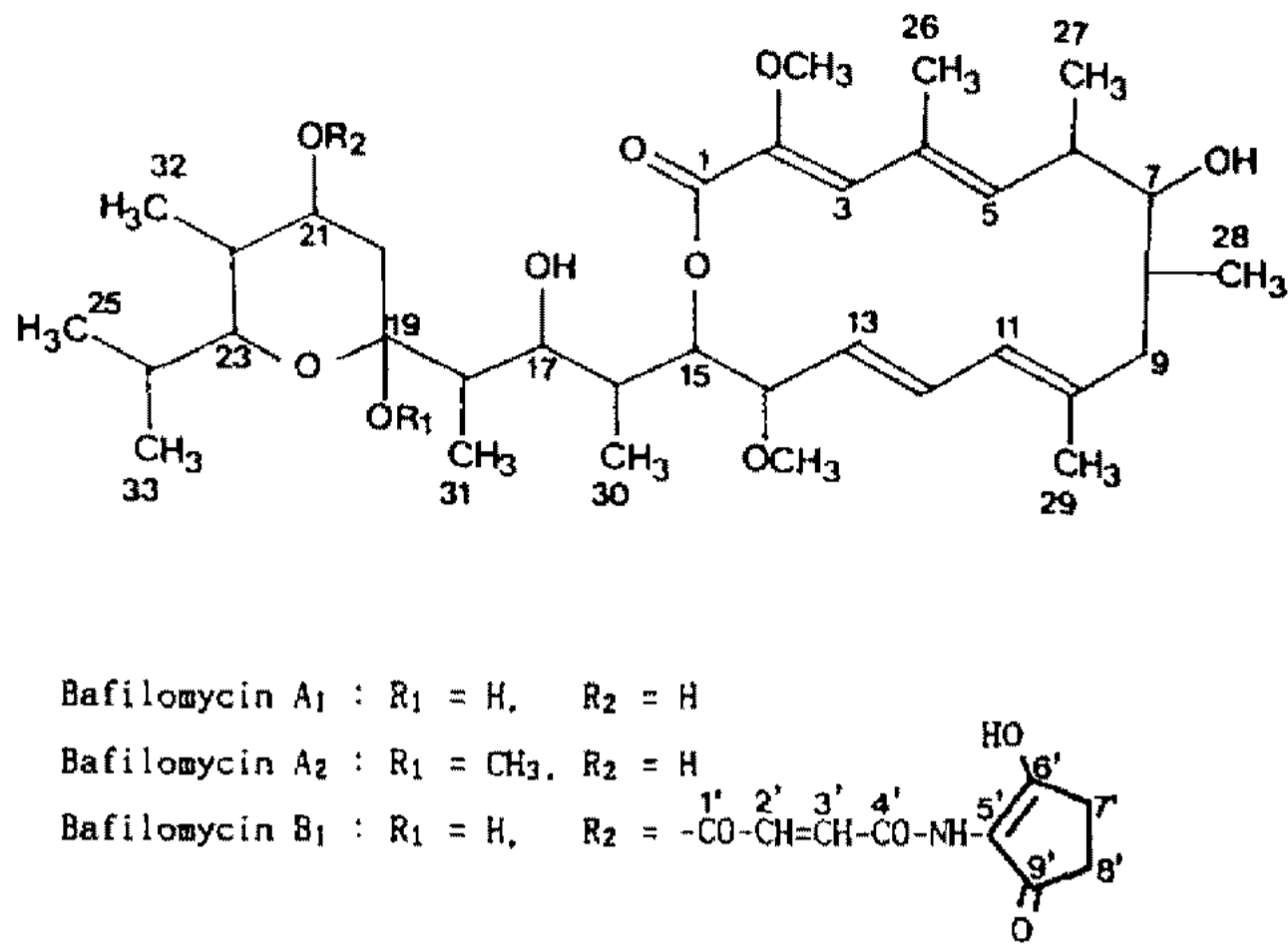


Fig. 3. Structures of insecticidal compounds from *Actinomycetes* isolate no. 1166.

Compound I: bafilomycin A<sub>2</sub>, Compound II: bafilomycin B<sub>1</sub>

(amide NH) ppm과, <sup>13</sup>C-NMR에서 164.5, 133.7, 133.8 및 164.3 ppm 등의 peak들은, bafilomycin E나 setamycin의 부분 구조인 flavensomycinic acid의 NMR data와 잘 일치하여 본 화합물을 bafilomycin B<sub>1</sub>으로 동정하였다(Fig. 3). Compound II의 구조에 대한 NMR data는 현재 수집중이며, 살충활성, 항균활성, UV pattern 및 TLC 발색 결과 등으로 볼 때, 역시 bafilomycin 계열 화합물로 추정된다.

## 요 약

국내 토양으로부터 토양 방선균을 분리하여 1, 2차 살충활성 검정으로 살충성 물질 생산 균주들을 선발하고, 이들이 생산하는 살충성 물질들을 분리하는 연구를 수행하여 왔다. 선발된 균주중 no. 1166 분리주가 생산하는 살충성 물질들을 분리 정제한 후, 각 물질들의 살충 및 항균활성을 조사하고 구조동정을 시도한 결과는 다음과 같다.

1. 살충 활성은, 본 실험조건에서 집누에 나방(*Bombyx mori*) 3령 유충에 분리된 물질들을 각량별로 처리한 결과, compound I과 compound II는 12.5 μg 수준에서 100% 살충효과를 나타냈으며, compound III는 50 μg 수준에서 100% 살충효과가 나타났다.

2. 항균 활성은, 6가지 피검균에 paper disc 방법으로 각각 20 μg을 처리한 결과 compound I과 II는 피검균 모두에 항균 활성이 나타나지 않았으며, compound III는 *Bacillus subtilis* 1021에 항균 활성이 나타났다.

3. 분리된 물질들을 UV spectrum과 <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR spectrum으로 구조동정을 시도한 결과, com-

pound I은 bafilomycin A<sub>2</sub>로, compound III는 bafilomycin B<sub>1</sub>으로 동정되었다. Compound II는 이화학적 특성과 생리활성이 동정된 두 화합물과 동일하게 나타난 결과로 보아 역시 bafilomycin 계열 물질로 추정되었다.

## 감사의 글

본 연구는 과학기술처에서 시행한 특정연구 개발사업(BSG70590-536-4) 연구내용중 일부이며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Tamura, S., N. Takahashi, S. Miyamoto, R. Mori, S. Suzuki, and J. Nagatsu. 1963. Isolation and physiological activities of piericidin A, a natural insecticide produced by *Streptomyces*. *Agr. Biol. Chem.* **27**: 576-582.
2. Oishi, H., T. Hosokawa, T. Okutomi, K. Suzuki, and K. Ando. 1969. Pesticidal activity of aureothin. *Agr. Biol. Chem.* **33**: 1790-1791.
3. Suzuki, A., M. Kanaoka, A. Isogai, S. Murakoshi, M. Ichinoe, and S. Tamura. 1977. Bassianolide, a new insecticidal cyclodepsipeptide from *beauveria bassiana* and *verticillium lecanii*. *Tetrahedron Lett.* **25**: 2167-2170.
4. Claydon, N. and J.F. Grove. 1982. Insecticidal secondary metabolic products from the entomogenous fungus *Verticillium lecanii*. *J. Invert. Pathol.* **40**: 413-418.
5. Huang, L., G. Albers-Schönberg, R.L. Monaghan, K. Jakubas, S.S. Pong, O.D. Hensens, R.W. Burg, D.A. Ostlind, J. Conroy, and E.O. Stapley. 1984. Discovery, production and purification of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> activated ATPase inhibitor, L-681, 110 from the fermentation broth of *Streptomyces* sp. MA-5038. *J. Antibiot.* **37**: 970-975.
6. Matsumoto, S., S. Sakuda, A. Isogai, and A. Suzuki. 1984. Search for microbial insect growth regulators; L-alanosine as an ecdysis inhibitor. *Agr. Biol. Chem.* **48**: 827-828.
7. Sakuda, S., A. Isogai, S. Matsumoto, and A. Suzuki. 1987. Search for microbial insect growth regulators II. allosamidin, a novel insect chitinase inhibitor. *J. Antibiot.* **40**: 296-300.
8. Murao, S., H. Hayashi, K. Takiuchi, and M. Arai. 1988. Okaramine A, a novel indole alkaloid with insecticidal activity, from *Penicillium simplicissimum* AK-40. *Agr. Biol. Chem.* **52**: 885-886.
9. Taniguchi, E., K. Imamura, F. Inshibashi, T. Matsui, and A. Nishio. 1989. Structure of the novel insecticidal sesquigignan, haedoxan A. *Agr. Biol.*

- Chem.* **53**: 631-643.
10. Watanabe, K., K. Umeda, and M. Miyakado. 1989. Isolation and identification of three insecticidal principles from the red alga *laurencia nipponica* Yamada. *Agr. Biol. Chem.* **53**: 2513-2515.
  11. Kawazu, K., J.P. Alcantara, and A. Kobayashi. 1989. Isolation and structure of neoannonin, a novel insecticidal compound from the seeds of *annona squamosa*. *Agr. Biol. Chem.* **53**: 2719-2722.
  12. Sanemitsu, Y., Y. Nakayama, T. Yano, and Y. Tanabe. 1989. S,N-Heterocycles 3, a novel insecticidal lead compound, 7-trifluoromethyl[1,2,4] triazolo[3,2-b]-thiazolo[4,5-b] pyridine. *Agr. Biol. Chem.* **53**: 2843-2844.
  13. Okada, A., K. Watanabe, K. Umeda, and M. Miyakado. 1991. Calyculin E and F, novel insecticidal metabolites from the marine sponge, *discodermia* sp. *Agr. Biol. Chem.* **55**: 2765-2771.
  14. Reddy, K., G. Jewett, R. Fatig, M. Brockman, C. Hatton, P. Savickas, D. Hasha, and C. Snipes. 1991. New insecticidal metabolites from soil isolate W719. *J. Antibiot.* **44**: 962-968.
  15. Bérdy, J. 1985. Screening, classification and identification of microbial products, Pp. 9-31. In M.S. Verral (ed.), *Discovery and Isolation of Microbial Products*, Ellis Horwood Limited, England.
  16. Suzuki, K., Y. Nawata, and K. Ando. 1971. Tetra-nactin, a new mitocidal antibiotic V. quantitative determination of macrotetrolide antibiotics. *J. Antibiot.* **24**: 675-679.
  17. Burg, R.W., B.M. Miller, E.F. Baker, J. Birnbaum, S.A. Currie, R. Hartman, Y.L. King, R.L. Monaghan, G. Olson, I. Putter, J.B. Tunac, H. Wallick, E.O. Stapley, R. Oiwa, and S. Omura. 1979. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents; producing organism and fermentation. *anti-microb. agents chemocher.* **15**: 361-371.
  18. Takiguchi, Y., H. Mishima, M. Okuda, and M. Terao. 1980. Milbemycins, a new family of macrolide antibiotics; fermentation, isolation and physico-chemical properties. *J. Antibiot.* **33**: 1120-1127.
  19. Nonomura, H. and M. Hayakawa. 1988. New methods for the selective isolation of soil actinomycetes, Pp. 288-293. In Okami, Y., T. Beppu, and H. Ogawara (ed.), *Biology of Actinomycetes '88*, Japan Scientific Societies Press, Japan.
  20. Fabre, B., E. Armau, G. Etienne, F. Legendre, and G. Tiraby. 1988. A simple screening method for insecticidal substances from *actinomycetes*. *J. Antibiot.* **41**: 212-219.
  21. 오세량, 이형규, 구본탁, 최수근, 박상구, 신병식, 박승환, 김정일. 1994. *Streptomyces* sp. no. 46이 생산하는 살충성 물질 구조 동정. *한국농화학회지* **37**: 110-114.
  22. Werner, G., H. Hagenmaier, H. Drautz, A. Baumgartner, and H. Zahner. 1984. Metabolic products of microorganisms. 224. bafilomycins, a new group of macrolide antibiotics. *J. Antibiot.* **37**: 110-116.
  23. Baker, G.H., P.J. Brown, R.J.J. Dorgan, J.R. Everett, S.V. Ley, A.M.Z. Slawin, and D.J. William. 1987. A conformational study of bafilomycin A, by X-ray crystallography and NMR techniques *Tetrahedron Lett.* **28**: 5565-5568.
  24. Otoguro, K., A. Nakagawa, and S. Omura. 1988. Setamycin, a 16-membered macrolide antibiotic, identification and nematocidal activity. *J. Antibiot.* **41**: 250-252.
  25. Hensens, O.D., R.L. Monaghan, L. Huang, and G. Albers-Schonberg. 1983. Structure of the sodium and potassium ion activated adenosinetriphosphatase inhibitor L-681,110. *J. Am. Chem. Soc.* **105**: 3672-3679.
  26. Kretschmer, A., M. Dorgerloh, M. Deeg, and H. Hagenmaier. 1985. The structures of novel insecticidal macrolides: bafilomycins D and E, and oxohygroliodin. *Agr. Biol. Chem.* **49**: 2509-2511.
  27. Isogai, A., S. Sakuda, S. Matsumoto, M. Ogura, K. Furihata, H. Seto, and A. Suzuki. 1984. The structure of leucanicidin, a novel insecticidal macrolide produced by *Streptomyces halstedii*. *Agr. Biol. Chem.* **48**: 1379-1381.
  28. Goetz, M.A., P.A. McCormick, R.L. Monaghan, D.A. Ostlind, O.D. Hensens, J.M. Liesch, and G. Albers-Schonberg. 1984. L-155, 175: a new anti-parasitic macrolide fermentation, isolation and structure. *J. Antibiot.* **37**: 161-168.
  29. Seto, H., H. Akao, K. Furihata, and N. Otake. 1982. The structure of a new antibiotic, hygroliodin. *Tetrahedron Lett.* **23**: 2667-2670.
  30. Hatfield, G.M., R.W. Woodard. 1992. Isolation and structure determination of new macrolide antibiotics. *J. Nat. Prod.* **55**: 753-759.

(Received June 27, 1994)