은행잎과 외종피 유래 바이오농약 연구동향

한상빈* · 김종현

한국과학기술정보연구원 ReSeat 프로그램

Research Trend of Biopesticides from *Ginkgo biloba*(L.) Leaves and External Seed Coat

Sang-Bin Han*, Jong-Heon Kim

ReSeat Program, Korea Institute of Science and Technology Information,
335 Gwahangno, Yuseong-gu, Daejeon, 305-806, Korea

(Received on July 7, 2014. Revised on August 27, 2014. Accepted on September 2, 2014)

서 론

살아있는 화석이라 불리는 은행나무(*Ginkgo biloba* L.)는 2억7천만 년 전부터 지구상에 존재했던 Ginkgophyta 중 현재 유일하게 생존하는 식물로 중국이 원산지이나 한국과 일본 등 세계적으로 분포하고 있다(Wikipedia). 암수가 다른 낙엽성의 교목으로 수명은 1,000년을 넘고 곤충, 박테리아, 바이러스, 진균과 같은 다양한 병해충과 오염물질에 고도의 저항성을 갖고 있다(Jacobs 등, 2000).

잎에는 flavone, flavonoid glycoside, diterpene lactone, sesquiterpene, *p*-hydroxybenzoic acid, ascorbic acid 및 catechin과 같은 바이오활성성분이 함유되어 있을 뿐만 아니라(Van Beek 2002) ginkgolide A, B, C, J 및 bilobalide [$C_{15}H_{18}O_8$]로 알려진 diterpene trilactone은 강력한 항산화작용을 가져 광범위한 약리활성이 보고되었으며(Fig. 1), 이들 화합물은 벚말구에 대한 강력한 살충작용이 확인되었다(Ahn 등, 1997; Kwon 등, 1996). 더욱이 ginkgolic 또는 anacardic acid로 알려진 alkyl phenolic acid는 항종양(Itokawa 등, 1987)을 비롯하여 진균 과 박테리아의 활성을 억제하였다(Sati 등, 2011).

과거 연구는 외종피의 중요성을 무시한 채 잎의 유용성분에만 집중되면서 외종피는 폐기물로 인식되어 토양과 물에 대규모로 매장되면서 토양오염은 물론 강과 호수 어류에도

Fig. 1. Ginkgo leaves and seed (left), and terpene trilactone (right).

독성을 미치었으나 최근에는 외종피에 함유된 ginkgolic acid 등의 활성성분에 주목하기 시작하였다(Pan 등, 2006; So 등, 2012).

중국과 한국 등 유기농가에서는 박피과정의 과즙을 물로 희석하거나 은행잎 분말을 주정으로 추출하여 천연살충제로 사용하고 있으며, 수많은 해충방제에 만족할 만한 결과를 보이는 것은 살충활성성분이 함유되어 있음을 의미하는 것으로 기존의 합성농약을 대체할 수 있다.

2011년 Pszczolkowski 등은 사과에 만연하는 코들링나방(*Cydia pomonella*) 유충방제를 위하여 ginkgolic acid 등의 살충작용에 대한 화학구조별 비교시험을 실시하였고, bilobalide를 가수분해하거나 산화하여 벚말구 살충작용에 미치는 영향을 조사함으로써 구조 활성관계를 검토하였다(Yang 등, 2001). Trilactone terpene 화합물의 유기합성(Crimmins 등, 1993)이나 효과적인 추출법(Lichtblau 등, 2002; van Beek 등, 2009) 및 bilobalide와 ginkgolide 전합성과정이 밝혀졌으며(Corey 등, 1988; Desai 등, 1991), 계절이나 빛에 의한 성분의 조성변화와 같은 생리 및 화학적인 연구가 있

*Corresponding author

Tel: +82-42-869-0692, Fax: +82-42-869-0699

E-mail: jajook@resear.kr

었다(van Beek 등, 1992).

Bilobalide는 감수성과 저항성 계통의 버벌구에 대하여 기존의 버벌구방제용 살충제 fenobucarb나 carbofuran 보다 월등한 살충효과와 함께 안전성도 우수하여 포장적용 가능성이 매우 높지만(Ahn, 1997), 아직까지도 활성물질을 바이오노약으로 제조한 제품이 농약시장에 출시되지 못하고 있다. 최근에는 은행잎에서 식내서성(endohytic, 植内棲性) 진균을 분리한 후 에탄올로 추출하여 항균활성에 대한 조사에서 gliotoxin은 양호한 항균활성이 확인되었다(Li 등, 2011).

본고에서는 은행잎과 외종피에 함유된 각종 바이오활성성분의 추출과 정제, 분자합성과 구조 활성관계 및 살충과 살균작용에 관한 최근의 국제적인 연구동향을 검토하였다.

추출 및 정제

1596년 중국 본초강목(本草綱目)에 기침, 천식, 야뇨증, 알코올남용, 화농성피부감염 치료에 은행종자가 최초로 기록되면서 주목받기 시작하였다(van Beek 등, 2009). 은행잎과 외종피에는 다양한 성분이 함유되어 활성물질에 따라 추출과 분리 및 정제방법을 달리하는데 추출용매는 물, 메탄올, 에탄올, 클로로포름 등 다양하게 쓰이지만(Sati 등, 2011), ginkgolide, bilobalide, ginkgolic acid, flavonoid와 같은 살충 및 살균활성성분의 1차 추출용매로는 메탄올이 가장 널리 활용되고 있다(So 등, 2012).

2013년 Ding 등은 은행잎에 함유된 flavonoid 분리 및 정제에서 1차 메탄올 추출물을 에틸아세테이트와 물로 재추출한 후 칼럼크로마토그래프에서 분획별로 분리하고 HPLC로 13개 flavonoids를 정제하여 AChE(acetylcholineesterase) 억제활성을 조사하였다(Fig. 2).

은행 외종피를 에탄올로 추출한 후 실리카겔 칼럼에서 step gradient로 용출 및 분획하여 얻어진 ginkgolic acid[6-[(Z)-10-Hepta decenyl]-2-hydroxy-benzoic acid]의 살비활성을 확인한 바 있으며(Pan 등, 2006), 은행잎을 메탄올로 추출한 추출물을 클로로포름과 물로 분획한 후 클로로포름에 함유된 물질을 silica gel과 ODS 칼럼에서 분리 및 정제하였으며, HPLC로 분석한 결과 기존에 확인된 ginkgolic acid 이외의 새로운 ginkgolic acid 4종이 Fig. 3과 같이 확인되었다

Fig. 2. Structure of flavonoids.

Fig. 3. Four new ginkgolic acids.

Fig. 4. Ginkgolides A, B, C, J, M and bilobalide.

(Deguchi 등, 2014).

은행잎에서 효과적으로 신속하게 ginkgolide와 bilobalide를 추출하는 방법이 개발되었다. Ethyl acetate로 추출한 후 묽은 과산화수소와 수성의 염 추출물을 가열하고 염기용액으로 세척한 후 활성탄에서 여과하면 60~70%의 terpene trilactone이 함유된 황백색 분말을 얻을 수 있다. 과산화수소 처리는 염의 불필요한 성분을 분해시켜 추출하는 동안 고밀도 유화작용을 주도하였다. 더욱이 고분자수지를 이용한 역상크로마토그래피 추출은 바람직하지 않은 ginkgolic acid를 10 ppm 이하로 제거할 수 있었으며, 추출물에 분리한 Fig. 4의 ginkgolides A, B, C, J와 bilobalide는 표준샘플로도 이상적이었다(Lichtblau 등, 2002).

분자합성

1988년 Corey 등은 은행나무 *Ginkgo biloba*에서 생산하는 C₁₅ 다환 락톤 bilobalide[C₁₅H₁₈O₈](1)의 22단계 전합성을 기술하였다. 합성 1단계는 bicyclic enone (4) 형성을 위해 diester (3)의 딜리티오 유도체와 acetylenic ester (2)의 특이 전환반응이었으며, 천연 bilobalide 전합성에는 chiral (7) 활용과 enone (4) 형성이 주요 메커니즘이다(Fig. 5).

(±)-Ginkgolide B의 전합성 과정이 발표되었는데 Fig. 6과 같이 역합성 분석(retrosynthetic analysis)을 통하여 합성단계를 확인하였다. 스피로화합물 중간물질과 카르복시산 합성, [2 + 2]케톤-올레핀 고리부가반응, 광분해반응의 놀라운 결과와 입체화합물 확인, 링 E 완성, 링 C 구축과 Ginkgolide B 완성을 합성 단계별로 반응조건과 촉매사용 등 상세히 제시하였다(Desai 등, 1991).

구조 활성관계

2001년 Yang 등은 bilobalide의 구조 활성관계를 규명하기 위해 bilobalide를 가수분해 및 산화시켜 살충활성을 검

Fig. 5. Main intermediate, starting and end product.

Fig. 6. Retrosynthetic analysis of ginkgolide B.

정하였다. 분해물을 분석한 결과 염기 가수분해산물은 cyclopentenone계열의 화합물이었고, 산화물은 trilactone 형태를 유지한 sesquiterpene 구조로써 dehydration된 형태로 추정되었다. 분해물의 살충활성을 검증한 결과, 살충력의 크기는 bilobalide, monoacetyl 유도체, ginkgolide C, 산화분해물, diacetyl 유도체, 가수분해산물 순으로 감소하여 살충력은 trilactone 구조유지가 중요하였다(Fig. 7).

Table 1은 버벌구 *Nilaparvata lugens* 암컷 성충에게 국소 처리 24시간 후의 LC₅₀을 조사한 것으로 bilobalide는 0.64 ng으로 가장 높은 살충활성을 보였으며, mono-acetyl 치환체 1.94 ng > ginkgolide C 2.39 ng > 산화물 36.67 ng > diacetyl 치환체 46.15 ng 순이었으며, 구조가 변형된 가수분해산물은 240.46 ng로 가장 낮은 살충활성을 보였다.

Ginkgolide B는 10 mg/mL의 농도로 코들랑나방(*Cydia pomonella* L.) 신생유충의 먹이활동을 억제하였으나 ginkgolide A와 C는 별다른 효과를 보이지 않았다. 또한 Fig. 8의 ginkgolic acid(GA)-C_{15:0}은 1 mg/mL의 농도로 *C. pomonella* 유충거동을 억제하였으나 GA-C_{13:0}, GA-C_{15:1},

Fig. 7. Bilobalide structure.

Table 1. Insecticidal activities of bilobalide and its derivatives against *Nilaparvata lugens* adults determined by topical application

Product	Time (hrs)	LD ₅₀ (ng/♀)
Bilobalide	24	0.64
	48	0.47
Mono-acetate	24	1.94
	48	1.27
Ginkgolide C	24	2.39
	48	2.07
Oxidation product	24	36.67
	48	22.74
Diacetate	24	46.15
	48	19.14
Hydrolysis product	24	240.46
	48	167.30

Fig. 8. Structures of ginkgolic acids.

GA-C_{17:1}은 그 효과를 보이지 않아 체인길이와 이중결합에 따라 큰 차이를 보였다(Pszczolkowski 등, 2011).

살충작용

은행잎에서 분리한 bilobalide 10은 버벌구(*Nilaparvata lugens* Stal)의 경련과 마비를 야기하여 바이오살충제로서의 강력한 잠재력에 주목하게 되었다(Ahn 등, 1997). 최근에는 식물유도 신호케미컬(semiochemical)을 이용한 새로운 방제

방법에 집중하면서 ginkgolic acid(GA-C_{15:0})와 bilobalide 및 ginkgolide B는 0.1~10 mg/mL로 코들링나방(*Cydia pomonella* L.) 유충의 거동 억제작용이 확인 되었다(Pszczolkowski 등, 2011).

아노펠레스모기(*Anopheles stephensi*)는 다양한 합성살충제에 저항성이 발달하여 방제가 곤란하지만 4령의 유충에 은행잎 에탄올과 메탄올 추출물은 양호한 방제효과를 보였으며(Ahmad 등, 2011), 은행잎에서 분리한 13개 flavonoids (Table 2)는 벼멸구의 AChE(acetylcholinesterase) 활성을 억제하였고 IC₅₀은 57.8~133.1 µg/mL이었다(Ding 등, 2013).

2011년 Thompson 등은 5-HT₃ (5-hydroxytryptamine type3) receptor 길항제로 알려진 bilobalide와 ginkgolide B 작용부위인 통로(channel)에서의 결합위치를 조사하였다. 정확한 결합위치를 입증하기 위해 공극내벽 잔기와 치환한 5-HT₃ receptor를 구축하고 손톱개구리 *Xenopus laevis* 난모세포에

발현시킨 후 5-HT 유도전류에 미치는 이들 화합물의 영향을 조사한 결과 돌연변이 receptor의 EC₅₀은 다른 야생형보다 6배 이상 낮아 저항성을 보였고, bilobalide와 ginkgolide B의 pIC₅₀(-logIC₅₀) 값은 3.33, 3.14이었다.

최근에는 외종피 추출물과 살충활성성분에 주목하고 있다. 단백질과 글리코겐 및 지질은 번데기와 성체발생을 조절하는데 외종피의 메탄올 추출물은 영양저장 변화와 함께 파밤나방(*Spodoptera exigua*) 유충의 성장을 억제하였고 LD₅₀을 조사한 결과 1.92ng이었으며(Table 3), 치사율은 92.44%이었다(So 등, 2012)

외종피에서 추출 및 동정한 살비기질의 6-[(Z)-10-heptadecenyl]-2-hydroxy-benzoic acid (ginkgolic acid)는 꿀응애 *Panonychus citri* (Mcg)에 대한 바이오검정에서 처리 24시간 후 LC₅₀이 5.2 mg/L로 강력한 접촉 독성을 보였으며 (Table 4), 살충제 pyridaben (3.4 mg/L)과 유사한 수준이었

Table 2. AChE inhibitory activity of flavonoids 1~15

No	Flavonoid name	IC ₅₀ (B ¹ /mL)
1	Kaempferol	100.5
2	Quercetin	95.8
3	Ermanin	88.5
4	Quercetin-3-O-α-L-rhamnopyranoside	110.9
5	Quercetin-3-O-α-D-glucopyranoside	79.4
6	Quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside	57.8
7	Quercetin-3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranoside	77.5
8	Quercetin-3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside	73.1
9	Acacatin-3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside	97.8
10	Quercetin-3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranoside	112.6
11	Kaempferol-3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside	101.7
12	Taxifolin	133.1
13	Genistein	103.8
	Chlorpyrifos(insecticide)	12.4

Table 3. Median lethal dose of methanol extract of seed coat of *Ginkgo biloba* against third instar larvae of *Spodoptera exigua*

	LD ₉₅	LD ₈₀	LD ₅₀	LD ₄₀	LD ₂₀	LD ₁₀
Slope ± SE	(95% confidence limits, ng/larva)					
0.53 ± 0.14	22.92 (16.25-37.19)	6.83 (5.61-8.72)	1.92 (1.55-2.30)	1.31 (0.99-1.62)	0.54 (0.34-0.74)	0.28 (0.15-0.42)

LD₅₀, median lethal dose.

Table 4. Contact (24h) toxicity of test compounds against *Panonychus citri*.

	Corrected mortality (%)							
Concentration (mg/l)	3.13	6.25	12.50	25.00	78.13	156.25	312.50	625.00
Ginkgolic acid	22.8	67.1	81.9	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Pyridaben	50.3	55.0	65.8	85.2	100.0	100.0	100.0	100.0
Omethoate	-	-	-	-	25.5	63.1	75.2	98.7

*based on the average of three replication.

Fig. 9. Ultrastructure of snail's mitochondrial image by TEM. Snails were exposed to GA-C13:0 and niclosamide. (A) Control snail mitochondria, (B) the mitochondrial of snails exposed to niclosamide with no obvious injury found in the mitochondria, and (C) mitochondria of snail exposed to GA-C13:0 showing fragmented cristae, membrane disruptions, edema and matrix vacuolation.

Fig. 10. *Spodoptera exigua* larva (1), *Cydia pomonella* L. (2), *Panonychus citri* (3), *Anopheles stephensi* (4), *Nilaparvata lugens* (5), *Oncomelania hupensis* (6) *Limax maximus* (7), *Xenopus laevis* (8), *Plutella xylostella* (9) and *Tetranychus urticae* (10).

고 omethoate (122 mg/L) 보다는 월등하였다(Pan 등, 2006). 더욱이 본 화합물은 pyridaben이나 omethoate보다 신속한 살비활성으로 응애 각피의 강력한 침습작용을 하지만 식물 독성은 보이지 않았다.

2012년 Li 등은 은행 외종피와 잎에 함유된 GA는 새로운 종류의 연체동물 특히 민달팽이 살충작용이 보고되었으나 그 메커니즘은 거의 규명되지 못하고 있음에 주목하였다. GA-C_{13:0}에 의한 민달팽이 미토콘드리아 손상을 TEM(투과 전자현미경)으로 조사하였고 RT-PCR(실시간 중합효소 연쇄 반응)로는 5개 미토콘드리아 효소의 유전자 발현 프로파일을 조사한 결과 전반적인 미세구조 변화와 함께(Fig. 9), cytochrome c 산화효소, ATP 합성효소, cytochrome b 및 dihydronicotinamide adenine dinucleotide (NADH) 탈수소 효소 유전자 발현을 억제하였고 처리 12시간 후 LD₅₀은 47.64 mg/L이었다. 이상에서 검토한 각종 해충(Fig. 10)에 대한 살충활성은 Table 5에 요약하였다.

살균작용

은행나무는 종자를 포함한 식물전체가 병해충에 강한 저항성을 가져 1997년 Murata 등은 은행에서 분리한 anacardic acid (Ana)의 박테리아와 이스트의 지질합성 억제 시험에서 Ana-a (Fig. 11)는 박테리아 *B. subtilis*의 성장과 이스트 *Lipomyces starkeyi*의 지질축적 억제를 확인하였다.

은행잎의 항균물질을 검색하기 위해 메탄을 추출물을 다시 ethyl acetate로 추출한 후 HPLC로 정제한 화합물은 기

존의 ginkgolic acid나 bilobalide와 상이하였고, 0.12 µg/mL으로 장구균(*Enterococcus faecalis*)에 강력한 억제활성을 보였다(Mazzanti 등, 2000).

2000년 Wang 등은 분자량 13 kDa의 단일체인 항균 단백질을 은행종자에서 분리하여 ginkbilobin으로 명명하였는데 이 단백질의 N 말단시퀀스는 하얀 가문비나무 배아에 풍부한 단백질과 매우 유사하였다. 잣빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*)에 대한 IC₅₀은 0.25 µM이었으며(Fig. 12), 갈색반점을 야기하는 *Mycosphaerella arachidicola*, 시들음병균(*Fusarium oxysporum*), 잎집무늬마름병균(*Rhizoctonia solani*), 먹물버섯(*Coprinus comatus*)에 항균활성을 보였다. 또한 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) 및 대장균(*Escherichia coli*)과 같은 박테리아에도 살균작용을 하였다.

은행잎에서 분리한 항균펩티드(GAFP)는 벼잎집무늬마름병균(*Pellicularia sasakii*), 사과과일썩음병균(*Alternaria alternata*), 붉은곰팡이병(*Fusarium graminearum*) 및 검은점무늬병균(*Fusarium moniliforme*)에 활성을 보였으나 진균에 따라 차이가 있었다(Huang 등, 2000). 특히 100 µg/mL의 GAFP를 *P. sasakii* 균사에 처리하였을 시 균사 막 투과를 증가시키고 배지의 신속한 알칼리화를 야기하였고, GAFP의 아미노산시퀀스는 수많은 키틴결합단백질 중 cysteine과 glycine이 풍부한 키틴결합 도메인을 갖는 특성을 보였다.

추출용매를 달리하여 5개 동식물병원성 균주 *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*,

Table 5. Summary of insecticidal activity from ginkgo leaf or seed coat extract and chemical components

Chemicals or extracts	Target Pests	Mode of action (MoA)	Activity concentration	Authors
Seed coat MeOH extract	<i>Spodoptera exigua</i> larva	Growth inhibition	LD ₅₀ 1.92 ng	So et al. (2012)
GA-C _{15:0}	<i>Cydia pomonella</i> L. larva	Behavior inhibition	1 mg/mL	Pszczolkowski et al. (2011)
Bilobalide			0.1 mg/mL	
Ginkgolide B			10 mg/mL	
Seed coat ginkgolic acid	<i>Panonychus citri</i>	Contact toxicity	LC ₅₀ 5.2 mg/L	Pan et al. (2006)
Root, stem, leaf, seed coat MeOH extract	<i>Nilaparvata lugens</i> <i>Plutella xylostella</i> <i>Tetranychus urticae</i>	Insecticidal	500 µg/mL	Lee et al. (2003)
Bilobalide	<i>Nilaparvata lugens</i>	Convulsion, paralysis	0.01 g	Ahn et al. (1997)
Leaf EtOH, MeOH extract	<i>Anopheles stephensi</i> larva	Insecticidal	LC ₅₀ 2.846 mg/mL, LC ₅₀ 0.761 mg/mL	Ahmad et al. (2011)
Seed coat benzene extract	<i>Oncomelania hupensis</i>	Inhibition of ChE, ALT, ALP etc. activity	-	Chen et al. (2007)
13 Flavonoids	<i>Nilaparvata lugens</i>	AChE inhibition	IC ₅₀ 57.8~133.1 µg/mL	Ding et al. (2013)
Bilobalide, ginkgolide B	<i>Xenopus laevis</i> oocyte	5-HT ₃ binding position	pIC ₅₀ 3.33, pIC ₅₀ 3.14	Thompson et al. (2011)
Seed coat GA-C _{13:0}	<i>Limax maximus</i>	Mitochondria fragmentation	LD ₅₀ 47.64 mg/L	Li et al. (2012)

Fig. 11. Structures of anacardic acid-a.

Fig. 12. Determination of IC₅₀ of antifungal activity of ginkbilobin against *B. cinerea*. Lower right: Mes buffer control. Lower left: 0.24 μM ginkbilobin. Upper right: 1.2 μM ginkbilobin. Upper left: 6 μM ginkbilobin. The IC₅₀ was determined to be 0.25 μM.

Erwinia chrysanthemi, *Xanthomonas phaseoli*에 미치는 은
행잎 추출물의 항균활성을 조사한 결과 메탄올 > 클로로포
름 > 에탄올 > 헥산 순이었으며, 최소억제농도는 메탄올추출
물이 7.8 µg/mL로 모든 균주에서 확인되었다(2011, Sati 등).

국내산 은행나무(*Ginkgo biloba*) 뿌리, 외종피, 가지 등 부위별 메탄을 추출물의 진균류, 일반세균 및 해충에 대한 생물활성을 조사한 결과 푸른곰팡이 병균(*T. harzianum*)과 대장균(*E. coli*) 등에 200 µg/disc 농도에서 저해활성을 보였

고 줄기부위가 더 높은 항균활성을 보였다. 특히 버섯 배양 상의 표면에 1 mg/mL 수준으로 처리할 경우 푸른곰팡이 병 발생을 상당히 억제시키는 효과를 보였다(Lee 등, 2003). 또한 대장균(*E. coli* O157:H7)의 바이오필름 형성에 미치는 ginkgolic acid의 억제시험에서는 Fig. 13에서와 같이 현저한 억제효과를 보였다(Lee 등, 2014).

유해녹조류 방제에는 천연식물제제가 유용자원으로 인식되어 은행 외종피의 ginkgolic acid에 주목하였다(Zhang 등, 2014). 은행 외종피를 식유에테르로 추출한 ginkgolic acid는 독성 시아노박테리아 *Microcystis aeruginosa*를 효과적으로 억제하였는데 EC_{50.3d}와 EC_{50.7d}는 3.26, 2.03 mg/L이었다.

노출 12~96시간 동안 유전자 발현과 생리적 변화 및 세포형태를 조사한 결과 형태학적 손상과 세포용해를 보였고, superoxide dismutase 활성과 항산화제를 감소시키고 malondialdehyde 함량은 증가시켜 산화손상을 야기하였다. 3개 광합성유전자 *psaB*, *psbD*, *rbcL* 전사와 2개 영양섭취와 관련된 유전자 *ntcA*, *phoU*가 억제되었다. 또한 ginkgolic acid는 microcystin 함량은 물론 microcystin과 관련된 유전자 전사에도 영향을 미치었다. 따라서 생리적 및 생화학적 반응에 다면발현 영향으로 *M. aeruginosa*의 성장을 억제하였다.

2011년 Hantano 등은 은행유래 지질전이 단백질과 항균 성분에 대한 연구에서 ginkgotoxin[C₉H₁₃O₃N]을 분리하여 분자수준의 활성메커니즘을 기술한 바 있으며, 최근에는 은행나무에 기생하는 식내서성 진균이 병원성 미생물로부터 숙주식물을 방어하여 이들 진균의 분리 및 분비화합물에 주목하기 시작하였다(Xiao 등, 2013). 80종의 식내서성 진균

Fig. 13. Biofilm reductions achieved using ginkgolic acids. EHEC (*E. coli* O157:H7) biofilm formation (OD_{570}) was quantified in the presence of ginkgolic acid-C_{15:1} (A), ginkgolic acid-C_{17:1} (B) at 37°C after 24 h in 96-well plates.

Fig. 14. Morphological characteristics of strain CDW7. (e) Scanning electron micrographs of hyphae and ascospores.

의 항균활성을 한천내확산법으로 조사한 결과 가장 활성을 보인 CDW7 균주는 현미경과 rRNA 유전자시퀀스 데이터에서 *Chaetomium globosum*으로 동정되었고, 형태학적 특성은 주사전자현미경(SEM)으로 관찰하였다(Fig. 14).

CDW7 배양배지를 3배 희석하여도 *in vitro*에서 *Fusarium graminearum* 분생자 발아와 균사성장을 완전히 억제하였다. 따라서 *Fusarium* spp.와 관련된 보리와 밀의 공통적인 푸사륨위조병은 *in vivo*에서의 안티식물병원성 활성검정에 활용하였으며, CDW7 배지발효에서는 54.9%의 보호효과와 48.8%의 치유효과를 보였다.

생물학적 정량을 위한 접근에서 flavipin(1,2-benzenedicarboxaldehyde-3,4,5-trihydroxy-6-methyl)이 분리되었고(Fig. 15), 일부 식물병원성 진균 특히 *F. graminearum*의 성장을 현저히 억제하였는데 EC_{50} 이 0.73 µg/mL로 살균제 carben-

Fig. 15. Chemical structure of flavipin (1,2-benzenedicarboxaldehyde-3,4,5-trihydroxy-6-methyl).

dazim과 비교할 만한 수준이었다(Table 6). 따라서 본 화합물은 살균제나 새로운 살균제 리드화합물로 사용할 수 있을 것으로 사료되었다.

앞서 검토한 바와 같이 식물기생 진균은 항암이나 항균 및 기타 바이오활성과 함께 다양한 구조의 2차대사산물로 인식되고 있다. 2011년 Li 등은 은행잎에서 식내서성 *Chaetomium globosum* (NM0066) 진균을 분리한 후 EtOAc로 추출하여 항균활성에 대한 생물학적 및 화학적 조사에서 gliotoxin 등의 화합물을 분리하였으며(Fig. 16), gliotoxin은 *Fusarium sulphureum*, *Alternaria alternata* 및 *Claviceps sorghi*에 대하여 EC_{50} 이 각각 68.5, 36.8 및 59.8 mg/mL로 양호한 항균활성이 확인되었다.

은행나무 유래 새로운 jasmonate 의존 방어유전자의 발현과 특성 및 분자클로닝에 대한 연구가 수행되었다(Shena 등, 2005). Gbd로 명명한 은행나무 defensin의 cDNA 전체길이는 534 bp이었으며, Gbd 유전자는 손상이나 methyl jasmonate 처리로 상향조절이 확인되어 이 유전자는 식물이 손상된 동

Table 6. EC_{50} of flavipin against plant-pathogenic fungi

	Flavipin	Carbendazim	Chlorothalonil	Procymidone
Pathogenic fungi			(µg/mL)	
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	3.68 ± 0.23	0.15 ± 0.03	-	-
<i>Fusarium graminearum</i>	0.73 ± 0.09	0.50 ± 0.08	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	2.62 ± 0.15	1.42 ± 0.14	-	-
<i>Phytophthora capsici</i>	2.76 ± 0.12	-	4.48 ± 0.40	-
<i>Alternaria solani</i>	12.35 ± 0.90	-	-	2.19 ± 0.10

Table 7. Thesis distribution according to the nations and years

Rank	Nation	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	Total	(%)
1	USA	3	4	4	7	3	6	7	7	5	6	52	21.31
2	China	1	2	3	1	1	6	5	9	7	13	48	19.67
3	India	1	1	0	0	0	3	4	5	6	3	23	9.43
4	Brazil	1	0	1	2	1	4	2	4	3	2	20	8.20
5	Canada	2	2	1	1	0	2	0	3	4	1	16	6.56
5	Germany	0	0	0	1	2	4	1	1	3	4	16	6.56
7	UK	0	0	1	0	0	2	4	2	4	2	15	6.15
8	Italy	0	1	1	0	1	2	0	3	3	1	12	4.92
9	New Zealand	2	1	1	0	1	1	1	1	0	0	8	3.28
10	France	0	0	2	1	1	0	0	0	3	0	7	2.87
11	South Korea	0	0	0	0	0	0	1	2	2	1	6	2.46
12	Japan	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	4	1.64

Fig. 16. Gliotoxin isolated from *Chaetomium globosum*.

안에도 병원체에 내성을 갖는 것으로 예측되었다.

2012년 Yuan 등은 은행나무 식내서성 박테리아를 분리하고 *Bacillus amyloliquefaciens* CGMCC 5569로 명명하였다. 이 균주의 ethyl acetate 추출물과 여액 모두는 변재변색진균 *Lasiodiplodia rubropurpurea*, *L. crassisporea*, *L. theobromae*의 성장을 억제하였다. 여액 ethyl acetate 추출물에서는 fengycin, surfactin 및 bacillomycin이 함유된 일련의 안티진균 화합물 lipopeptide가 얻어졌으며, *in vitro*에서 *L. rubropurpurea*, *L. crassisporea*, *L. theobromae*의 성장을 각각 70.22%, 69.53%, 78.76% 억제하여 CGMCC 5569 진균의 강력한 변재변색 억제활성과 바이오활성성분은 바이오방제 자원으로 제공될 수 있다.

연구동향

본 동향분석에는 Web of Science (Thomson Reuters) 데이터베이스에서 검색어(pesticid* or biopesticid* or insecticid* or fungicid*)와 (ginkgo or endophyt* or "seed coat*" or sarcotesta)를 사용하여 최근 10년간의 동향을 검색한 결과 244편이 수집되었다. 연도별 각국의 논문 수는 Table 7과 같으며, 분석 대상기간의 연평균 증가율은 논문 수 기준 12.66%, 누적 논문 수 기준 38.51%로 지속적인 증가경향을 보였다(Fig. 17).

미국은 52편으로 가장 많은 논문을 발표하여 전체의 21.31%를 차지하였고 우리나라는 6편으로 11위이었다. 전

Fig. 17. Accumulation and increasing of the papers according to the years.

체논문의 평균 피인용 수에 대한 국가별 논문의 평균 피인용 수를 기반으로 질적 수준평가(1.0기준)를 하였을 때 일본은 논문 당 (수준지수)/(피인용 수)가 2.636/22.75로 가장 우수하였고 이탈리아(2.597/22.417)와 미국(1.609/13.885)은 2, 3위이었다.

결론

은행잎과 외종피 유래 다양한 활성물질의 분리·동정과 일부화합물의 전합성을 비롯하여 구조별 살충 및 살균활성을 평가하는 다양한 기초연구가 수행되고 있었다. 은행유래 바이오농약 제품은 아직까지 출시되지 않고 있지만 합성농약이 갖는 환경에서의 잔류독성이나 저항성발달과 같은 문제점을 극복할 수 있어 유기농업에서는 소원재료 추출물을 병해충방제에 활용하고 있다.

바이오활성을 갖는 ginkgolide, bilobalide, ginkgolic acid, flavonoid 등의 살충 및 살균작용은 방제대상 병해충에 따라 합성농약과 대등하거나 그 이상의 효과를 보여 향후전망은 밝은 것으로 사료되었다. 식내서성 진균과 이들의 분비물을

활용한 항균작용이나 *E. coli*에 의한 식중독예방 및 유해녹조류 방제 등 다양한 분야에 활용될 수 있는 잠재력을 보였으며, 살충범위도 벼멸구와 파밤나방, 응애류 등 이외에도 크게 확대될 것으로 기대되었다.

감사의 글

본 연구는 2014년도 한국과학기술정보연구원이 미래창조과학부 과학기술진흥기금과 복원기금으로 수행하는 「ReSeat 프로그램」에 의해 수행된 기술동향분석의 일부로 이에 감사드립니다.

Literature cited

- Ahmad, N., H. Fazal, B. H. Abbasi and M. Iqbal (2011) *In vitro* larvicidal potential against *Anopheles stephensi* and antioxidative enzyme activities of *Ginkgo biloba*, *Stevia rebaudiana* and *Parthenium hysterophorus*. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, pp. 169-175.
- Ahn Y.J., M. Kwon, H. M. Park and C. K. Han (1997) Potent insecticidal activity of *Ginkgo biloba*-derived trilactone terpenes against *Nilaparvata lugens*. ACS Symposium Series 658:90-105.
- Chen, S. X., L. Wu, X. M. Yang, X. G. Jiang, L. G. Li, R. X. Zhang, L. Xia and S. H. Shao (2007) Comparative molluscicidal action of extract of *Ginkgo biloba* sarcotesta, arecoline and niclosamide on snail hosts of *Schistosoma japonicum*. Pesticide Biochemistry and physiology 89(3): 237-241.
- Corey, E. I. and W.G. Su (1988) Enantioselective total synthesis of bilobalide, a C₁₅ ginkgolide. Tetrahedron Letters 29(28): 3423-3426.
- Crimmins, M. T., D. K. Jung and J. I. Grey (1993) Synthetic studies on the ginkgolides: total synthesis of (±)-bilobalide. Journal of the American Chemical Society 115:3146-3155.
- Deguchi, J., Y. Hasegawa, A. Takagi, S. Kutsukake and H. Morita (2014) Four new ginkgolic acids from *Ginkgo biloba*. Tetrahedron Letters, in printing:1-4.
- Desai, M. C., A. K. Ghosh, M. C. Kang and I. N. Houpi (1991) Total synthesis of (±)-ginkgolide B. Strategies and Tactics in Organic Synthesis 3:89-119.
- Ding, X., M. A. Ouyang, X. Liu and R. Z. Wang (2013) Acetylcholinesterase Inhibitory Activities of Flavonoids from the Leaves of *Ginkgo biloba* against Brown Planthopper. Journal of Chemistry 2013:1-4.
- Hatano, K. I., T. Miyakawa, Y. Sawano and M. Tanokura (2011) Antifungal and Lipid Transfer Proteins from *Ginkgo (Ginkgo biloba)* Seeds. Nuts & Seeds in Health and Disease Prevention, Chapter 63:527-534.
- Huang, X., W. J. Xie and Z. Z. Gong (2000) Characteristics and antifungal activity of a chitin binding protein from *Ginkgo biloba*. FEBS Letters 478:123-126.
- Itokawa H., N. Totsuka, K. Nakahara, K. Takeya, J. P. Lepoittevin and Y. Asakawa (1987) Antitumor principles from *Ginkgo biloba* L. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 35(7):3016-3020.
- Jacobs, B. P. and W. S. Brownwe (2000) *Ginkgo biloba*: a living fossil. American Journal of Medicine 108(4):341-342.
- Kwon M., Y. J. Ahn, J. K. Yoo and B. R. Choi (1996) Potent insecticidal activity of extracts from *Ginkgo biloba* leaves against *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). Applied Entomology and Zoology 31:162-166.
- Lee, H. B., O. S. Kwon, H. N. Kim, M. K. Kim and C. J. Kim (2003) Bioactivities of Korean ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) extract and its potential as a natural pesticide. Research in Plant Disease 9(2):99-103.
- Lee, J. H., Y. G. Kim, S. Y. Ryu, M. H. Cho and J. T. Lee (2014) Ginkgolic acids and *Ginkgo biloba* extract inhibit *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* biofilm formation. International Journal of Food Microbiology 174:47-55.
- Li, H. Q., X. J. Li, Y. L. Wang, Q. Zhang, A. L. Zhang, J. M. Gao and X. C. Zhang (2011) Antifungal metabolites from *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus in *Ginkgo biloba*. Biochemical Systematics and Ecology 39:876-879.
- Li, X., F. Deng, X. Shan, J. Pan, P. Yu and Z. Mao (2012) Effects of the molluscicidal agent GA-C_{13:0}, a natural occurring ginkgolic acid, on snail mitochondria. Pesticide Biochemistry and physiology 103(2):115-120.
- Lichtblau, D., J. M. Berger and K. Nakanishi (2002) Efficient Extraction of Ginkgolides and Bilobalide from *Ginkgo biloba* Leaves. Journal of Natural Products 65:1501-1504.
- Mazzanti, G., M. T. Mascellino, L. Battinelli, D. Coluccia, M. Manganaro and L. Saso (2000) Antimicrobial investigation of semipurified fractions of *Ginkgo biloba* leaves. Journal of Ethnopharmacology 71:83-88.
- Murata, M. J. Irie and S. Homma (1997) Inhibition of Lipid Synthesis of Bacteria, Yeast and Animal Cells by Anacardic Acids, Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase Inhibitors from *Ginkgo*. Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 30:458-463.
- Pan, W., P. Luo, R. Fu, P. Gao, Z. Long, F. Xu, H. Xiao and S. Liu (2006) Acaricidal activity against *Panonychus citri* of a ginkgolic acid from the external seed coat of *Ginkgo biloba*. Pest Management Science 62:283-287.
- Pszczolkowski, M. A, k. Durden, S. Sellars, B. Cowell and J. J. Brown (2011) Effect of *Ginkgo biloba* Constituents on Fruit-infesting Behavior of Codling Moth(*Cydia pomonella*) in Apples. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59(20):10879-10886.
- Sati, S. C. and S. Joshi (2011) Antibacterial Activities of *Ginkgo Biloba* L. Leaf Extracts. The Scientific World Journal 11:2241-2246.
- Shena, G., Y. Z. Pang, W. Wu, Z. Miao, H. Qian, L. Zhao, X.

- Sun and K. Tang (2005) Molecular cloning, characterization and expression of a novel jasmonate-dependent defensin gene from *Ginkgo biloba*. *Journal of Plant Physiology* 162:1160-1168.
- So, S.S., T. H. Hwang and W. Akram (2012) Insecticidal activities of *Ginkgo biloba* seed coat extracts against *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Entomological Research* 42(3):158-162.
- Thompson, A. J., R. K. Duke and S. C. R. Lummis (2011) Binding Sites for Bilobalide, Diltiazem, Ginkgolide, and Picrotoxinin at the 5-HT₃ Receptor. *Molecular Pharmacology* 80(1):183-190.
- van Beek, T. A and P. Montoro (2009) Chemical analysis and quality control of *Ginkgo biloba* leaves, extracts, and phytopharmaceuticals. *Journal of Chromatography A* 1216:2002-2032.
- van Beek, T. A. (2002) Chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaves and extracts. *Journal of Chromatography A* 967(1):21-55.
- van Beek, T. A. and G. P. Lelyveld (1992) Concentration of ginkgolides and bilobalide in *Ginkgo biloba* leaves in relation to the time of year. *Planta Medicine* 58:413-416.
- Wang, H. and T. B. Ng (2000) Ginkbilobin, a Novel Antifungal Protein from *Ginkgo biloba* Seeds with Sequence Similarity to Embryo-Abundant Protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 279:407-411.
- Web of Science, <http://apps.isiknowledge.com>
- Wikipedia (2014) *Ginkgo biloba*. <http://www.wikipedia.org>
- Xiao, Y., H. X. Li, C. Li1, J. X. Wang, J. Li, M. H. Wang and Y. H. Ye (2013) Antifungal screening of endophytic fungi from *Ginkgo biloba* for discovery of potent anti-phytopathogenic fungicides. *FEMS Microbiology Letter* 339:130-136.
- Yang, E. Y., S. M. Hong, Y. J. Ahn and O. K. Kwon (2001) Insecticidal Activities of Bilobalide from *Ginkgo biloba* Leaves and its Derivatives. *The Korean Journal of Pesticide Science* 5(1):24-29.
- Yuan, B., Z. Wang, S. Qin, G. H. Zhao, Y. J. Feng, L. H. Wei and J. H. Jiang (2012) Study of the anti-sapstain fungus activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CGMCC5569 associated with *Ginkgo biloba* and identification of its active components. *Bioresource Technology* 114:536-541.
- Zhang, C., F. Ling, Y. L. Yi, H. Y. Zhang and G. X. Wang (2014) Algicidal activity and potential mechanisms of ginkgolic acids isolated from *Ginkgo biloba* exocarp on *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Applied Phycology* 26(1):323-332.