

은행나무 추출물의 생물활성 및 천연물농약으로 이용 가능성

이향범 · 권오성 · 김한나¹ · 김미경¹ · 김창진*한국생명공학연구원 생물소재연구부, ¹대덕중학교Bioactivities of Korean Ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) Extract and Its Potential as a Natural PesticideHyang Burm Lee, Ohsung Kwon, Hannah Kim¹, Mikyung Kim¹ and Chang-Jin Kim*

Biomaterial Research Division, Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, Daejeon 305-600, Korea,

¹Daedok Middle School, Daejeon 305-340, Korea

(Received on April 2, 2003)

Bioactivities of Korean ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) extract were investigated against several fungi, general bacteria and insect pests. Crude methanolic extracts of different parts of Korean ginkgo showed different bioactivities depending on the target organisms. The methanolic extract showed *in vitro* antimicrobial activity at dose of 200 ug per paper disc. The extract of ginkgo stalk was some higher than seed coat and root. The extract also showed a remarkable *in vivo* antifungal activity against green mold (*Trichoderma harzianum*) on compost surface of spawn bags and *in vivo* insecticidal activity to *Nilaparvata lugens*, *Plutella xylostella* and *Tetranychus urticae*. This study suggests that Korean ginkgo extracts have a potential as a natural pesticide.

Keywords : *Ginkgo biloba*, bioactivities, natural pesticide

은행나무(*Ginkgo biloba*)는 Ginkgoaceae과에 속하는 수목류로서 북중국이 원산이며 생존하는 수목류중 가장 오래된 살아있는 화석(living fossil) 식물로서 병, 해충, 오염물질에 고도의 저항성을 갖고 있다(Jacobs와 Browner, 2000). 역사적으로 은행잎은 책에 발생하는 해충을 막기 위해 사용되기도 하였으며, 중국에서는 전통적으로 열매와 잎 추출물을 천식과 같은 폐질환 및 심장병 치료에 사용하여 왔으며, 오늘날에도 은행나무는 미생물, 항균, 항산화 활성 등 다양한 생리활성 효능을 갖는 천연물 의약품 원료로서 수요면에서 1순위를 차지하고 있다(Jacobs와 Browner, 2000). 식물유래 천연물의 이용에 대한 관심이 부각되기 시작한 이래(Balandrin 등, 1985), 1997년 판매 기준으로 은행잎 추출물의 경우 미국에서 약 2억 4천만불, 독일에서는 처방약 제조와 관련하여 5백만불 이상이 사용되어왔다(Brevoort, 1998). 은행잎은 플라보노이드(ginkgolides, quercetin, kaempferol), sesquiterpenes, p-

hydroxybenzoic acid, diterpene lactones, ginkgolic acid, bilobetin, pro-anthocyanidins, ascorbic acid 및 catechin이 다량 함유되어 있고, 은행잎은 식물성 정유, 지방산, 탄닌 및 수지 등을 많이 함유하고 있다(Jacobs와 Browner, 2000). 은행나무 유래 간질, 펙틴, 히스티딘, 전분, 단백질, 지방, 당분, 엘고스테린, 징코라이드 A,B,C와 진놀, 프라보놀 등은 현대의학에서 큰 기대를 받고 있으며, 최근에는 은행나무 추출물이 Alzheimer병 치료에도 효과적인 것으로 보고되고 있다(Oken 등, 1998). 은행나무 잎은 플라보노이드 함량이 가장 높은 가을이 시작될 때 수확하는 것이 좋다고 알려져 있는데 플라보노이드는 살균, 살충 효과가 있어 갖가지 벌레의 유충, 식물에 기생하는 곰팡이, 바이러스 등을 죽이거나 억제하는 작용이 있다고 알려져 있다(Huang 등, 2000; Iwu 등, 1999). 은행나무 추출물은 비교적 안전하고 독성이 거의 없다는 것이 천연물 의약 및 농약으로서 개발시 매우 유리한 점으로 받아들여지고 있으며 특히, 우리나라 자생 은행나무가 외국의 것에 비해 유효성분의 함량이 10~100배나 많다고 알려져 있어 그 이용성면에서도 매우 가치가 높을 것으로 판단된다.

세계적으로 작물 수확 전후의 농업해충에 의한 피해는

*Corresponding author

Phone)+82-42-860-4332, Fax)+82-42-860-4595

E-mail)changjin@kribb.re.kr

대략 20%에 달하는 것으로 알려져 있으며 특히, 곰팡이 병에 의한 피해는 대략 80%에 달할 정도로 매우 크다 (Agrios, 1997). 오늘날, 무공해, 무독성의 환경친화적인 농업이 요구되고 있는 상황에서 식물유래 천연물이 각광 받고 있다(Benner, 1993; Neale, 2000; Pillmoor 등, 1993). 이러한 관점에서 은행나무는 생리활성물질이 다량 함유되어 있기 때문에 천연의약 및 병해충 방제제로서 유용하게 이용될 수 있다(Cowan, 1999; Mazzanti 등, 2000; Wink, 1993).

따라서 본 연구는 우리나라에 자생하는 은행나무 부위별 추출물의 병원미생물과 해충에 대한 항균 및 살충활성을 평가하고 은행나무 유래 천연 병해충방제제 개발을 위한 기초자료를 얻기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

식물시료. 은행나무 시료는 강릉 지역에 자생하는 대략 100~600년된 은행나무로부터 잎, 줄기, 뿌리, 열매부위를 대략 0.5~1 kg씩 취하여 잘게 자른 후 건조시켜 마쇄기로 갈은 후 70% 메탄올로 추출하였다. 추출물은 여과지(No 2, Toyo Roshi)를 사용하여 여과하고, 회전감압 증류기로 농축하고, 동결건조시킨 후 2~3°C에 보관하면서 본 검정시험에 사용하였다.

항미생물활성. 항균활성 검정을 위해 사용한 공시균은 *Escherichia coli* KCTC1924, *Bacillus subtilis* KCTC1914, *Salmonella typhimurium* SL-1926, *Staphylococcus aureus* KCTC1916, *Staphylococcus aureus* KCTC1928(아미노글리코사이드계를 비롯한 다종의 항생제 내성균주), *Candida albicans* KCTC1940, *Alternaria alternata* AL-PP1(tenuazonic acid 생성균주), *Aspergillus flavus* AF-01(aflatoxin 생성균주), *Penicillium citrinum* KCTC6927, *Trichoderma harzianum* HBL-01, *Chlorella regularis* HBL-01이다. 항균활성 조사는 paper disc(8 mm)를 이용한 agar diffusion 법으로 실시하였으며, 검정배지는 세균의 경우 LB 배지를, 효모의 경우는 yeast extract-peptone-glucose 배지를, 곰팡이의 경우 potato dextrose agar(PDA) 배지를 사용하였다. 검정용 배지는 평판에 전배양액을 세균 및 효모의 경우 0.2~0.5%, 곰팡이의 경우 대략 ml당 10^6 ~ 10^8 개의 포자농도가 되게 배지와 잘 혼합하여 25 ml씩 분주하여 조제하였다. 활성 검정은 조제된 배지에 살균된 paper disc에 50 μ l의 추출물을 분주한 후 곰팡이는 27°C에서 효모와 세균은 각각 30, 37°C 배양기에서 배양한 후 형성된 저지환(직경)을 측정하여 조사하였다.

푸른곰팡이병 발생 억제효과 검정. 공시균으로는 양

송이버섯 재배단지의 피해 시료에서 직접 분리한 푸른곰팡이병원균(*T. harzianum* HBL-01)을 사용하였다. 은행나무 추출물의 항균활성 검정은 버섯배양상 표면에서 실시하였다. 즉, 미송톱밥과 농도(100~2,000 ppm)별로 조정된 추출물과 잘 섞은 혼합물을 퇴비 배양상 표면에 1 cm 정도 도포하였다. 그 표면 위에 푸른곰팡이 병원균의 포자 현탁액(대략 ml당 10^7 개)을 분무접종하고 적당한 수분을 공급하여 주면서 푸른곰팡이병의 발생 및 생육정도를 주기별로 육안으로 조사하였다.

살충활성 검정. 동결건조된 추출물시료는 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹인 후 Triton X-100에 1% 농도로 희석하여 처리하였다. 대상해충은 벼멸구(*Nilaparvata lugens*), 배추좀나방(*Plutella xylostella*), 담배거세미나방(*Spodoptera litura*), 복숭아혹진딧물(*Myzus persicae*), 두점박이응애(*Tetranychus urticae*)를 사용하였다. 벼멸구에는 벼유묘상의 암컷 성충에 추출물을 공기분무기를 이용하여 뿌리는 spray법을, 배추좀나방 및 담배거세미나방은 배추잎을, 두점박이응애에는 콩잎을, 복숭아혹진딧물에는 담배잎을 추출물에 30초간 담근 후 꺼내어 그 위에 유충을 올려놓는 leaf-dipping법을 사용하였으며, 사육온도는 24~28°C, 상대습도는 50~80%이었다. 본 활성검정은 한국화학연구원 농약활성실에 의뢰하여 실시하였다.

결과 및 고찰

본 연구는 국내에 자생하고 있는 은행나무(*Ginkgo biloba*) 뿌리, 열매껍질, 가지 부위별 항균, 항세균 및 살충활성능을 조사하고 병해충 방제를 위한 천연물농약으로서 잠재성을 알아보기 위하여 실시하였다. 연구결과 은행나무 추출물은 200 μ g/disc수준에서 버섯 푸른곰팡이 병원균(*T. harzianum*)을 비롯한 곰팡이에 대해 *in vitro* 항균활성을 보였으며 또한 *A. alternata*, *A. flavus* 및 *P. citrinum* 등의 균류에 대해서도 부위 및 검정균간에 약간의 차이가 있는 하지만 항균활성을 나타냈으며, 500 μ g/disc수준으로 처리할 경우 대부분의 추출물이 높은 활성(20 mm 이상의

Table 1. Antifungal activity of Korean ginkgo (*Ginkgo biloba*) extract against some fungi

Parts used	TH ^a	AA	AF	PE
Seed coat	9 ^b	10	10	NE
Stalk	12	10	10	9-12
Root	10	NE	NE	NE

^aTH: *Trichoderma harzianum*; AA: *Alternaria alternata*; AF: *Aspergillus flavus*; PC: *Penicillium citrinum*.

^bInhibition zone (diameter, mm) at dose of 200 μ g/disc. NE: no effect.

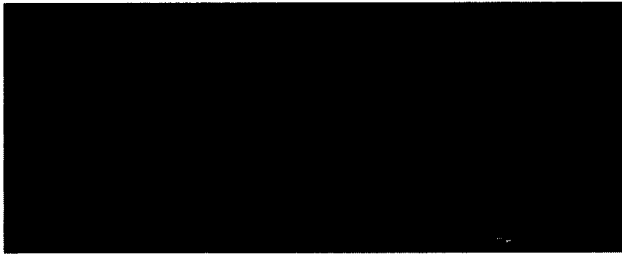


Fig. 1. Antifungal activity of Korean ginkgo (*Ginkgo biloba*) extract against green mold, *Trichoderma harzianum* HBL-01. The picture shows inhibition zones (>20 mm) caused by crude methanolic extracts from seed coat (left), root (middle) and stalk (right) at dose of 500 ug/disc.

저지환)을 나타냈다. 특히, 줄기 부위의 추출물은 항균활성이 더 높았으며, 스펙트럼도 넓은 경향을 보였으며, *P. citrinum*에 대해서도 항균활성을 나타냈다(Table 1, Fig. 1). 한편, 은행나무 추출물의 푸른곰팡이병 발생 억제효과를 양송이 배양상 표면에 0.1~2 mg/ml 수준으로 처리한 후 *in vivo* 저해활성을 조사한 결과, Table 2에서 보는 바와 같이 1 mg/ml의 수준에서 완전한 저해효과를 나타냈다. 한편, *T. harzianum*이외에도 *A. alternata*, *A. flavus* 및 *P. citrinum*에 대해서도 추출물별로 차이를 보이긴 하나 대체로 높은 *in vivo* 항균활성을 나타냈다(자료 미제시). 한편, 전 세계적으로 버섯재배지에서는 푸른곰팡이(green mold)로서 잘 알려진 *T. harzianum*균에 의한 경제적 피해가 심각한데(Beyer 등, 2003; Samuels 등, 2002; Wink, 1998), 현재 benomyl과 chlorothalonil 농약이 푸른곰팡이병의 발생을 억제하기 위하여 많이 사용되고 있으나 처리방법도 중균집중진 배양상에 직접 처리하여야만 큰 효과를 볼 수 있고, 버섯에 부작용을 일으키지 않는 조건에서 처리하여야 하기 때문에 제한적으로 사용될 수 밖에 없는 실정이다. 본 연구를 통해 은행나무 추출물이 *Trichoderma* 병원균을 비롯한 진균류의 생육 및 발생을 지연 및 억제시키는 효과를 확인하였는 바 식물병 및 저장병 방제용 천연물농약으로서의 개발 가능성을 보여주

Table 2. The *in vivo* antifungal activity of Korean ginkgo (*Ginkgo biloba*) extract against green mold, *Trichoderma harzianum* HBL-01 on surface of spawn compost

Part used	Inhibition of moldy growth		
	500 ppm	1,000 ppm	Control (no treatment)
Stalk	++*	+++	-
Root	++	+++	-

-: no inhibitory effect; +: minor inhibitory effect; ++: moderate inhibitory effect; +++ high inhibitory effect on growth of green mold.

Table 3. Antibacterial activity of Korean ginkgo (*Ginkgo biloba*) extract against some bacteria

Parts used	SA ^a	BS	EC
Seed coat	9 ^b	NE	NE
Stalk	NE-9	NE	NE-12
Leaf	9	9	12

^aSA: *Staphylococcus aureus*, BS: *Bacillus subtilis*, EC: *Escherichia coli*.

^bInhibition zone(diameter, mm) at dose of 200 ug/disc, NE: no effect.

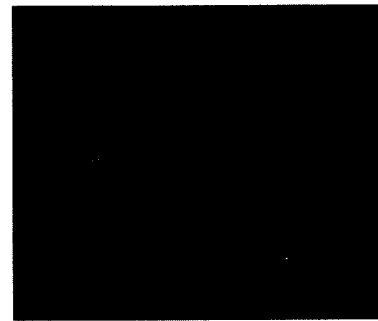


Fig. 2. Antibacterial activity of Korean ginkgo (*Ginkgo biloba*) extracts from seed coat (SC), stalk (S) and leaf (L) against *Staphylococcus aureus* at dose of 500 ug/disc. C: control (streptomycin).

었다는 점에서 그 의의가 크다고 하겠다.

한편, 항세균활성을 검정한 결과 Table 3과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 추출물 부위별로 약간의 차이를 보이긴 하지만 *B. subtilis*, *E. coli* 및 *S. aureus*균에 대해 대체로 200 ng/disc에서 활성을 보이며, 500 ug/disc수준에서 매우 높은 항세균활성을 보였다. 은행나무 추출물은 *E. coli*에 대해 더 높은 활성을 나타냈으나 100 ug/disc 이하의 농도에서는 활성을 나타내지 않았으며, 잎 추출물은 공시 세균 모두에서 활성을 나타냈다.

한편, 은행나무 추출물의 벼멸구, 배추좀나방, 담배거세미나방, 복숭아혹진딧물 및 두점박이응애에 대한 *in vitro* 살충활성을 조사한 결과, 500 ppm의 농도에서는 은행깍질 부분을 제외한 잎, 줄기, 뿌리 부위별 추출물 대부분

Table 4. Insecticidal effect of Korean ginkgo (*Ginkgo biloba*) extract against some insects

Parts used	BPH ^a	DBM	TSSM
Seed coat	55 ^b	NE	50
Leaf	100	10	60
Stalk	85-100	NE-100	10-70
Root	85-100	NE-10	NE-50

^aBPH: brown plant hopper; DBM: diamondback moth; TSSM: two-spotted spider mite.

^bMean % of mortality at dose of 500 ug/ml, NE: no effect.

Table 5. Insecticidal effect of Korean ginkgo (*Ginkgo biloba*) extract against brown plant hopper (BPH)

Parts used	Concentration (ug/ml)					
	250	130	60	30	15	8
Root-1	100 ^a	100	95	90	85	35
Root-2	100	100	90	40	35	30

^aMean % of mortality at different dose.

에서 벼멸구, 배추좀나방, 점박이응애에 대한 높은 살충 효과를 보여 은행나무내에 살충성분이 풍부함을 확인하였다(Table 4, 5). 이러한 활성농도는 타 식물시료의 활성농도가 >2,000 ppm 수준에서 활성을 보이는 것과 비교할 때 매우 높은 활성으로 판단된다(Lee 등, 2001). 지금까지 은행잎이 벼멸구에 대해서 활성이 있다는 것은 이미 밝혀진 바 있지만(Ahn 등, 1997) 은행나무 뿌리추출물에서 강한 살충활성이 관찰된 것은 본 연구가 처음이며, 벼멸구 이외에도 배추좀나방, 두점박이응애에서도 활성이 있음이 처음 관찰되었다. 특히, 뿌리 추출액을 8~250 ppm 농도로 희석하여 벼멸구에 처리한 후 *in vivo* 살충활성을 조사한 결과 8, 15 ppm의 낮은 농도에서도 각각 30, 85%의 살충활성을 나타내 해충 방제용 천연물농약으로의 잠재성을 보여주었다.

이처럼 본 연구는 은행나무 추출물이 친환경 농업차원에서 병해충 방제용 천연물농약으로 개발 가능성이 있음을 보여주었으며 앞으로 활성물질의 분리, 구조활성 연구 등을 통해 효율적으로 이용하는 방안이 요구된다.

요 약

본 연구는 국내산 은행나무(*Ginkgo biloba*) 뿌리, 열매 껍질, 가지 등 부위별 추출물의 진균류, 일반세균 및 해충에 대한 생물활성을 조사하였다. 연구 결과 푸른곰팡이 병균(*T. harzianum*) 및 대장균(*E. coli*) 등에 대해 200 ug/disc 농도에서 저해활성을 나타냈으며, 줄기부위가 더 높은 항미생물활성을 보였다. 특히 버섯 배양상 표면에 1 mg/ml 수준으로 처리할 경우 푸른곰팡이병의 발생을 상당히 억제시키는 효과를 나타냈다. 한편, 은행나무 부위별 추출물을 500 ug/ml으로 공시 해충에 처리하였을 경우 대부분의 추출물이 살충활성을 보이며 벼멸구, 배추좀나방, 두점박이응애에 대해 높은 살충활성을 나타냈으며, 특히, 벼멸구에 대해서 8 ug/ml의 낮은 농도에서도 살충활성을 나타냈다. 본 연구결과 국내산 은행나무 추출물이 항미생물 및 살충활성이 확인되었는 바 식물유래 병해충 방제용 천연물 농약으로서의 잠재성을 보여주었다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부가 주관하는 21세기 프론티어 식물다양성연구(PF002110-03) 사업의 일환으로 수행되었으며 이에 감사드립니다. 또한 살충활성검정 실험을 도와준 한국화학연구원 농약활성실에 감사드립니다.

참고문헌

- Agrios, G. 1997. Plant Pathology (4th edition). Academic Press, Sandiego, CA, USA.
- Ahn, Y. J., Kwon, M., Park, H. M. and Han, C. K. 1997. Potent insecticidal activity of *Ginkgo biloba* derived trilactone terpenes against *Nilaparvata lugens*. pp. 90-107. In: *Phytochemicals for pest control*, ed. by Hedin, P. A., Hollingworth, R. M., Masler, E. P., Miyamoto, J. and Thompson, D. G. ACS symposium series number 658. American Chemical Society, Washington, DC.
- Balandrin, M. J., Klocke, J., Wurtele, E. S. and Bollinger, W. H. 1985. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science* 228: 1154-1160.
- Benner, J. P. 1993. Pesticidal compounds from higher plants. *Pestic. Sci.* 39: 95-102.
- Beyer, D. M., Wuest, P. J. and Anderson, M. G. 2003. Green mold of mushrooms. On line journal. <http://mushgrowinfo.cas.psu.edu/index.htm>.
- Brevoort, P. 1998. The booming US botanical market-a new overview. *Herbalgram* 44: 33-46.
- Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Review* 12: 564-582.
- Huang, X., Xie, W. and Gong, Z. 2000. Characteristics and antifungal activity of a chitin binding protein from *Ginkgo biloba*. *FEBS Letters* 478: 123-126.
- Iwu, M. W., Duncan, A. R. and Okunji, C. O. 1999. New antimicrobials of plant origin. In: *Perspectives on new crops and new uses*, ed. by J. Janick. pp. 457-462. ASHS Press, Alexandria, VA.
- Jacobs, B. P. and Browner, W. S. 2000. *Ginkgo biloba*: a living fossil. *American Journal of Medicine* 108: 341-342.
- Lee, S.-G., Park, B.-S., Lee, S.-E., Son, J.-G., Song, C. and Lee, H.-S. 2001. Toxicity of various fruit tree extracts to five agricultural and four stored product anthropod pests. *Korean Journal of Pesticide Science* 5: 27-32.
- Mazzanti, G., Mascellino, M. T., Battinelli, L., Coluccia, D., Manganaro, M. and Saso, L. 2000. Antimicrobial investigation of semipurified fractions of *Ginkgo biloba* leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 71: 83-88.
- Neale, M. 2000. The regulation of natural products as crop-protection agents. *Pest Manag. Sci.* 26: 775-778.
- Oken, B. S., Storzbach, D. M. and Kaye, J. A. 1998. The efficacy

- of *Ginkgo biloba* on cognitive function in Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 55: 1409-1415.
- Pillmoor, J. B., Wright, K. and Terry, A. S. 1993. Natural products as a source of agrochemicals and leads for chemical synthesis. *Pesticide Sci.* 39: 131-140.
- Samuels, G. J., Dodd, S. L., Gams, W., Castlebury, L. A. and Petrini, O. 2002. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 94: 146-170.
- Wink, M. 1993. Production and application of phytochemicals from an agricultural perspective. In: *Phytochemistry and Agriculture*, ed. by T. A. van Beek and H. Breteler, pp. 171-213. Proc. Phytochem. Soc. Europe, Clarendon Press, Oxford.