

포도상구균에 대한 에탄올 농도별 은행잎 추출물의 항균효과에 관한 연구

† 이 인 화 · 심 윤 · ¹최 승 현 · 박 주 영 · 한 성 우 · 송 진 영 · ²윤 석 진

조선대학교 환경공학부 BK21 바이오키스기반 수소생산 전문인력양성사업팀, ¹(주)식물나라, ²조선대학교 화학교육과

(접수 : 2006. 7. 3., 게재승인 : 2006. 8. 23.)

A Study on the Antimicrobial Effect of *Ginkgo biloba* Leaves Extracts according to Concentrations of Ethanol for *staphylococcus aureus*

In-Hwa Lee†, Youn Shim, ¹Seung-Hyun Choi, Ju-Young Park,

Sung-Woo Han, Jn-Young Song, and ²Suk-Jin Yoon

Department of Environmental Engineering, BK21 Team for Biohydrogen Production,

Chosun University, gwangju 501-759, Korea

¹Phytoworld Co., Ltd.

²Department of Chemical Education, Chosun University, gwangju 501-759, Korea

(Received : 2006. 7. 3., Accepted : 2006. 8. 23.)

A optimal condition for the *Ginkgo biloba* extraction in ethanol and water binary solvent system has been proposed based on concentration of bilobalide and ginkgolide known as having a antimicrobial components in the range 5% to 70% ethanol in water at 80°C. Concentration of bilobalide as a single component of *Ginkgo biloba* leaves extract is the highest at the 60% ethanol and ginkgolide A and B is highest at 50% ethanol. Antimicrobial effect of *Ginkgo biloba* leaves extracts on the *S. aureus* was also examined by disc diffusion test and optical density test. In case of the disc diffusion test, the clean zone diameter was increased from 0.95 cm to 1.70 cm as ethanol concentration increased from 5 to 70%. However, over the 40% of ethanol concentration the antimicrobial effect was almost flat. Based on these results, we propose that the 40% of ethanol and 60% water solvent is most desirable for *Ginkgo biloba* extract considering vapor pressure problem in concentrating process after extraction. We introduced SEM and TEM to figure out the morphological change on the surface and inside body of *S. aureus* when *Ginkgo biloba* leaves extract was treated. After mixed with *Ginkgo biloba* leaves extract blast like blebs appeared on the surface of *S. aureus* cells and cell wall was not observed. From the these results, it seems that the *Ginkgo biloba* leaves extract including bilobalide and ginkgolide A, B prevent cell wall synthesis.

Key Words : *Ginkgo biloba* leaves extract, antimicrobial effect, *Staphylococcus aureus*

서 론

최근 활성이 있는 천연물에 대한 소비가 증가하고 있으며 천연물 항균제 분야에서도 부작용과 내성이 적은 식물 추출물의 이용이 증가하고 있다. 이에 따라 풍부한 생물자원으로부터 활성물질을 안전하면서도 효과적으로 추출하는 방법이 요구되고 있다(1). “살아있는 화석”이라고 불리는 은행나무 (*Ginkgo biloba* L.)는 은행나무과 (Ginkgoaceae)에 속하는 현존하는 유일한 식물이며(2), 생약제로서 혈전

용해제, 고혈압, 당뇨병 등에 사용되고 있으며, 예로부터 민간요법으로 수렴약, 진해제 등으로 사용하고 있다(3). 은행잎의 성분으로서는 주성분인 flavonoid계 화합물과 terpene계 화합물 외에 polyphenol, polysaccharide 등 100여종의 화합물이 밝혀졌으며, 이중 flavonoid glycoside류와 terpene류는 다양한 생리활성과 함께 의약품으로 개발되었다(4-9). 은행잎 주성분인 flavonoid류 중 bilobalide와 ginkgolide이 신경계질환을 치료하는데 효과가 있음이 보고된 바 있다(4). 최근 연구보고에 의하면 은행잎 추출물은 다양한 생리작용을 가지며, 특히 bilobalide와 ginkgolide는 살충 및 항균효과가 있는 것으로 알려져 있다(10-12). 그러나 이들 물질을 은행잎으로부터 효과적으로 추출하여 실제 식품첨가용 항균제 등 무독성 항균제로 사용하기 위해서는 독성이 없는 용매의 선택과 최적의 추출조건을 확립

† Corresponding Author : Department of Environmental Engineering, Gwangju 501-759, Korea

Tel : +82-62-230-7874, Fax : +82-62-234-6627

E-mail : ihlee@chosun.ac.kr

해야 한다. 또한 대표적인 식품부패균으로 알려진 *staphylococcus aureus*는 식물추출물을 이용한 항균 및 항진균성 검증연구는 많이 이루어지고 있으나 은행잎 추출물을 이용한 연구는 아직 보고된 바 없다. 포도상구균 (*staphylococcus aureus*)은 그람양성 구균 중 임상 검체에서 가장 흔히 분리되는 세균으로 건강한 성인의 비강 내에서 약 40%가 발견되며, 비강이나 피부 등에서 다른 사람에게 전파되는 것으로 알려져 있다. 포도상 구균에 대해 항균활성을 갖는 식물 추출물을 연구한 보고가 많이 있는데 그 중 Chung(13)은 포도상구균에 대해 손바닥 선인장 ethanol 추출물이 3.0 mg/ml 이상에서 증식이 지연되었다고 보고하였고, Park(14) 등은 갖의 물 추출물이 1000~1200 ppm 범위에서 균의 증식 억제 현상이 나타나기 시작하였다는 보고가 있다. Kang(15)은 갖의 에탄올 추출물 중 ethyl acetate 분획물은 포도상구균에 대해서 높은 항균활성이 있음을 보고한 바 있다.

본 연구에서는 은행잎 추출물의 최적의 추출조건을 확립하고 은행잎 추출물의 *staphylococcus aureus*에 대한 항균효과를 검증하기 위해 먼저 물에 대한 에탄올 농도별로 bilobalide와 ginkgolide를 성분을 분석하여 최적의 에탄올 농도를 제시하고 추출된 은행잎 추출물을 *S. aureus*에 처리한 후 생균수 측정 및 세포형태 관찰을 통해 은행잎 추출물의 항균 효과를 검증하고자 한다.

재료 및 방법

시료 제조

본 실험에 사용된 은행잎은 2001년 9월 하순과 10월 중순에 전남 장성 지역의 농장에서 채취하여 증류수로 수세한 후 음지에서 풍건시켜 완전 건조된 것을 믹서를 이용하여 분말로 만들어 사용하였다.

은행잎 분말 10 g에 대하여 H₂O, ethanol 농도 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70% (v/v)의 용매를 각각 100 ml씩 첨가하여 4시간 현탁한 후 membrane filter (0.45 µm, Millipore Co.)로 여과한 후 80°C에서 2시간동안 solvent extraction을 이용하여 증탕한 후 rotary vacuum evaporator로 농축하여 건조하고 고형물을 계면활성제 (1% tween20)을 이용하여 시료로 사용하였다.

균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주 *staphylococcus aureus* (KCCM 12214)는 한국중균협회로부터 분양받았다. 균 생육배지는 trypticase soy broth (TSB, pH 7.2, 27°C)에서 24시간 진탕 배양하였다.

Disc diffusion test

균주를 30°C에서 1~2일 배양한 후 이 균액을 배지 1 ml당 1 x 10⁶ cell이 포함되도록 접종하여 현탁하였다. 이 균체를 도말한 soft agar를 충분히 건조시킨 후 paper disc를 무균 조작에 의해 안착시켰고, 그 위에 각종 추출물 용액을 100 µl씩 주입하여 도말한 균체의 최적

생육온도에서 24시간 배양한 후 disc 주변에 생성된 clear zone (mm) 크기를 측정하여 항균활성정도를 측정하였다.

Optical density test

Trypticase soy broth 6 ml에 균 0.2 ml과 각각의 은행잎 추출물 0.6 ml를 접종하고 shaking incubator에서 최적 생육조건으로 배양시킴과 동시에 접종 시간부터 4시간 간격으로 spectrophotometer로 640 nm에서 측정하였다. 또한 추출물을 넣은 broth를 blank로 사용하였다.

다양한 에탄올 농도별 은행잎 성분 분석

항균활성 물질의 추출효율성을 검증하기 위하여 은행잎 분말 10 g에 대하여 H₂O, ethanol 농도 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70% (v/v)의 용매를 각각 100 ml씩 첨가하여 80°C에서 2시간동안 solvent extraction을 이용하여 증탕한 후 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC-UV)를 이용하여 분석정량화 하였다. 은행잎 성분분석 조건은 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Conditions of analysis on *Ginkgo biloba* leaves extract

Analytical instrument	HPLC (German sykam: S 7131 reagent organizer, S2100 solvent delivery system, S 5200 sample injector, S 3240 UV/VIS multichannel detector)
Detection:	UV 219 nm
Column	Luna 5 µ C ₁₈ (2) 250 × 4.60 mm
Flow rate	1 ml/min
Mobile phase	H ₂ O : THF : MeOH = 68.5 : 10.5 : 21
Injection Volume	20 µl
Chart speed	0.55 cm/min

주사전자현미경

*S. aureus*의 액체 배양을 배지 6 ml, 균주 0.2 ml, 40% 에탄올 추출물 1/16 농축액 0.6 ml를 첨가하여 12시간 배양한 후 osmic acid를 0.1% 농도가 되게 주입하여 전고정 하면서 원심 분리하여 집균하고 진공 건조 후 주사전자현미경 (SEM, Hitachi s-4700)을 이용하여 분해능이 15 kV, 1.5 nm, 작동거리 12 mm 조건 하에서 세포의 표면을 관찰하였다.

투과전자현미경

*S. aureus*의 액체 배양을 배지 6 ml, 균주 0.2 ml, 40% 에탄올 추출물 1/16 농축액 0.6 ml를 첨가하여 12시간 배양한 후 osmic acid를 0.1% 농도가 되게 주입하여 전고정 하면서 원심 분리하여 집균하였다. 여기에 1% osmic acid를 가하여 균을 고정 (4°C, overnight)시켜 agar로서 포매한 후 50, 60, 70, 80, 90, 95, 100% ethanol, propylene oxide는 각각 20분씩 100%와 propylene oxide는 각각 20분씩 2회 탈수시켰다. 탈수 후에 agar block을 epon mixture에 넣어서 수지를 침투시키고 35°C, 45°C, 60°C에서 각각 18시간씩 포매한 후 시료를 초박절편 (ultramicrotome, LKB)하여 uranyl acetate와 lead citrate로 염색하고 TEM (JEOL, JSM 2000FX2)으로 가속전압 80 kV 하에서 세균의 손상을 관찰하였다.

결과 및 고찰

다양한 에탄올 농도별 은행잎 성분 분석 결과

은행잎으로부터 추출용매를 5%~70% 에탄올을 이용하여 각 단계별로 활성성분을 비교한 결과 bilobalide는 60% 에탄올을 이용하여 추출하였을 때 가장 효율이 좋았고, ginkgolide A, B는 50% 에탄올을 사용했을 때 가장 효율이 좋았으며, 추출용매의 농도가 증가되면서 효율이 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 실제 생산에서 에탄올이 100% 회수 가능하지 않기 때문에 경제적인 점과 내용량 추출과정에서 가장 안정성이 있다고 판단되는 40% 에탄올 용매를 최적 활성농도로 결정하였다.

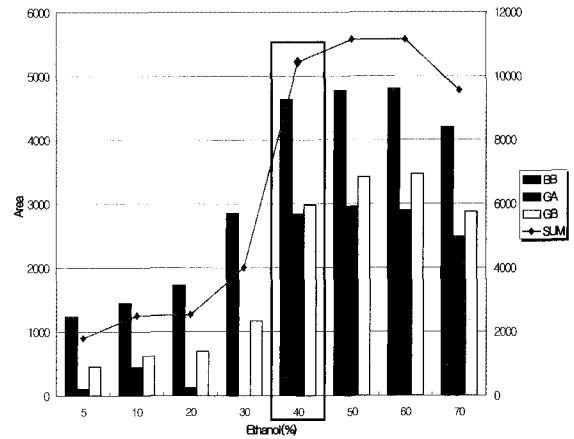


Figure 1. Quantitative analysis of the extracted active materials from *Ginkgo biloba* leaves using ethanol of various concentrations (BB-bilobalide, GA-ginkgolide A, GB-ginkgolide B).

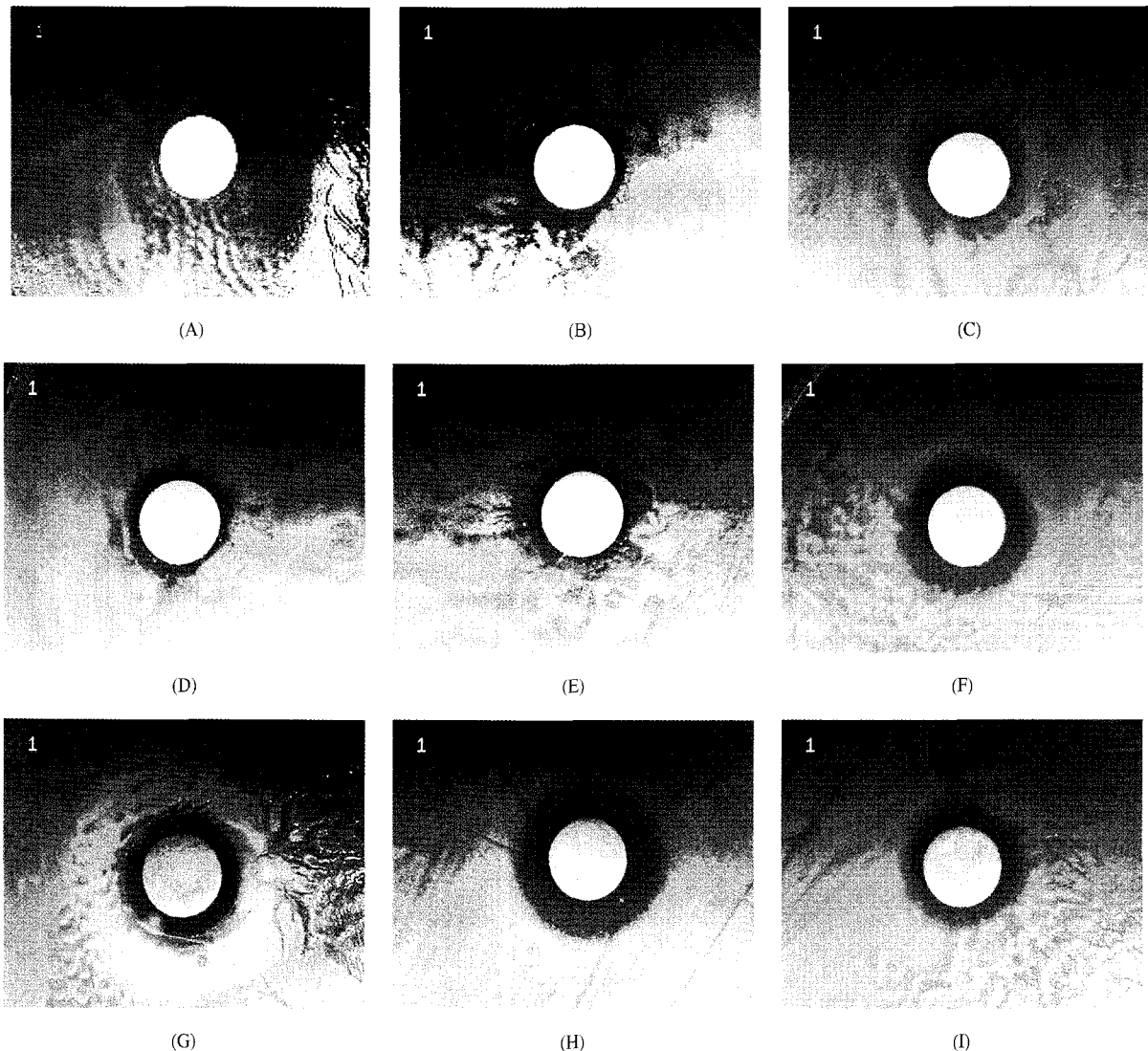


Figure 2. Comparison of antimicrobial effect for *S. aureus* on *Ginkgo biloba* leaves extract treated by various ethanol concentrations. The clean zone diameter was 0 cm, 0.95 cm, 0.95 cm, 0.98 cm, 1.0 cm, 1.8 cm, 1.8 cm, 1.8 cm, 1.7 cm in A) 0%, B) 5%, C) 10%, D) 20% , E) 30%, F) 40%, G) 50%, H) 60%, and I) 70%-ethanol extract respectively.

다양한 에탄올 농도별 은행잎 추출물의 항균활성 측정

다양한 에탄올 농도별 은행잎 추출물을 이용하여 증식저지환의 유무로 그 활성을 검색한 결과 Fig. 2에 나타나 있다. 5% ethanol 추출물은 0.95 cm, 10%-0.95 cm, 20%-0.98 cm, 30%-1.00 cm, 40%-1.80 cm, 50%-1.80 cm, 60%-1.80 cm, 70%-1.70 cm의 clear zone을 나타내었다. 즉 농도가 증가할수록 항균활성을 나타내는 inhibition zone의 크기가 증가하였으며, 40% 에탄올 농도 이상에서는 큰 차이가 없었다. Fig. 3은 Optical density test 결과를 나타낸 것으로 trypticase soy broth 6 ml에 균 0.2 ml와 각각의 은행잎 추출물 0.6 ml를 접종하고 shaking incubator에서 최적 생육조건으로 배양시킴과 동시에 접종 시간부터 4시간 간격으로 spectrophotometer로 640 nm에서 측정된 결과 10~40%까지는 항균활성이 증가하다가 40~70%에서는 항균활성에 큰 차이가 없었다. 이는 Fig. 1의 에탄올 농도별 성분분석 결과 40% 이상에서 bilobalide와 ginkgolide A, B의 추출효율이 큰 변화가 없어 항균활성이 증가하지 않는 것으로 생각된다.

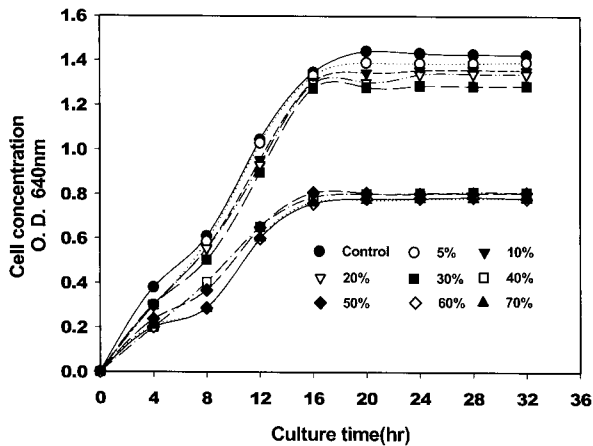


Figure 3. Comparison of antimicrobial effect for *S. aureus* on *Ginkgo biloba* leaves extract treated by various ethanol concentrations tested with optical density test (broth 6 ml, bacteria 0.2 ml, extract 0.6 ml).

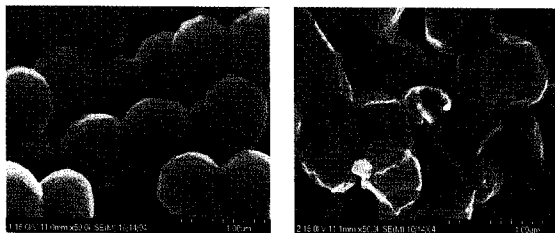


Figure 4. The effects of *Ginkgo biloba* leaves extract on *S. aureus* under SEM ((A) Normal *S. aureus* cells show typical spherical shape, grape-like clustering. Variation in size and shape, (B) After mixed with *Ginkgo biloba* leaves extract (40% ethanol extract $\times 16$), cell was broken by extract. Each figure magnified $\times 50,000$ (broth 6 ml, bacteria 0.2 ml, extract 0.6 ml)).

주사전자현미경을 통한 은행잎 추출물에 의한 세균의 손상 관찰

Fig. 4는 SEM을 통한 세포의 표면을 관찰한 결과이다.

대조군은 표면이 매끄럽고 형태가 유지되어 있는 반면에 은행잎 추출물 처리군은 세포표면이 심하게 손상되었으며 이로 인하여 세포막의 기능이 상실되었을 것으로 생각되어진다. 이는 항균제 처리에 의하여 미생물의 생리활성 효소 기능이 약화되거나 세포벽 또는 세포막이 파손되면 삼투기능이 상실되어 세포가 팽윤되어 사멸하는 보고(16)와 유사하다.

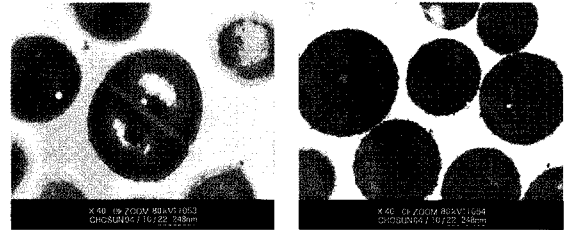


Figure 5. The effect of *Ginkgo biloba* leaves extract on *S. aureus* under TEM ((A) Normal *S. aureus* cells show typical spherical shape, as well as appearance of dividing cells. (B) The cell wall was not observed for the damage by *Ginkgo biloba* extract (40% ethanol extract obtained from *ginkgo biloba* leaves). Each figure magnified $\times 40,000$ (broth 6 ml, bacteria 0.2 ml, extract 0.6 ml)).

투과전자현미경을 통한 은행잎 추출물에 의한 세균의 손상 관찰

보다 자세한 형태변화를 알기 위하여 투과현미경으로 세포형태를 관찰하였다. Fig. 5는 투과전자현미경으로 세균의 손상을 관찰한 결과이다. 무처리군의 경우 뚜렷한 세포벽을 관찰할 수 있었으며, 은행잎 에탄올 추출물 처리군의 경우 세포벽이 없는 것으로 관찰되었다. *S. aureus*의 세포벽은 한 쪽의 peptidoglycan 층에 결합된 pentaglycine의 마지막 아미노기와 다른 층의 peptidoglycan 층에 결합된 D-alanine의 subterminal기의 카르복실기 사이에 peptide 결합이 이루어져 있는 것에 비추어 볼 때, bilobalide 또는 ginkgolide가 peptidoglycan의 형성을 억제 시키므로써 세포벽 합성을 저해하여 세포벽 및 세포막을 용해시켜 성장을 저해시키는 것으로 생각할 수 있는데 이를 규명하기 위해서는 단일 물질을 사용하여 보다 다양한 균주에 대하여 세포벽 손상 형태를 관찰하는 것이 요구되어 향후 연구과제로 진행하고자 한다.

요 약

본 연구에서는 은행잎 추출물의 *staphylococcus aureus*에 대한 항균효과를 검증하기 위해 먼저 에탄올 농도별로 bilobalide와 ginkgolide A, B의 성분을 분석한 결과 40% 에탄올 용매를 최적 활성농도로 결정하였다. Disc diffusion test, Optical density test을 통한 *S. aureus* 항균실험 결과 에탄올 추출농도가 증가할수록 항균효과가 증가하나 40% 에탄올 이상에서는 항균활성에 큰 차이가 없었다.

주사전자현미경을 통하여 은행잎 에탄올 40% 추출물 16 배 농축액을 처리한 균의 세포표면을 확인한 결과 심하게 손상되었음을 확인할 수 있었다. 투과전자현미경을 이용하

여 관찰한 결과 은행잎 추출물로 처리한 균주에서는 세포벽이 관찰되지 않았으며, 이는 은행잎 추출물의 주성분인 bilobalide와 ginkgolide A, B가 세포벽 합성을 저해하는 것으로 보여진다.

감 사

이 논문은 2002년도 조선대학교 교내 연구비 지원에 의하여 연구되었으므로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Kang, J. S. and S. H. Back (1995), Cytotoxicity and antimicrobial effects of extraction form *salvia miltiorrhiza*, *Kor. J. Pharmacogn.* **34**(4), 293-296.
- Kim, G. S., Y. W. Paek, K. M. Ko, S. J. Hwang, Y. J. Kim, S. J. Chung, and B. Hwang (1996), Detection of flavonoid compounds by cell culture of *Ginkgo biloba* L. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **11**(1), 1-7.
- Nam, S. J., K. U. Kim, D. H. Shin, and S. J. Hwang (1997), Identification of biologically active substances from *Ginkgo biloba* L., *Kor J. Weed. Sci.* **17**(4), 421-430.
- Tang, C., X. Wei, and Y. Chunhua (2003), Analysis of ginkgolides and bilobalide in *Ginkgo biloba* L. extract injections by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* **33**, 811-817.
- Deng, F. and S. W. Zito (2003), Development and validation of a gas chromatographic-mass spectrometric method for simultaneous identification and quantification of marker compounds including bilobalide, ginkgolides and flavonoids in *Ginkgo biloba* L. extract and pharmaceutical preparations, *J. Chromatography A.* **986**, 121-127.
- Jaracz, S., S. Malik, and K. Nakanishi (2004), Isolation of ginkgolides A, B, C, J and bilobalide from *G. biloba* extracts, *Phytochemistry* **65**, 2897-2902.
- Lee, W. K., Y. W. Ryu, S. Y. Byun, and H. G. Chun (1993), Effect of nutrients and culture conditions on the cell growth and the flavonol glycosides production in cell culture of *Ginkgo biloba*, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **8**, 55-61.
- Goh, L. M. L. and P. J. Barlow (2004), Flavonoid recovery and stability from *Ginkgo biloba* subjected to a simulated digestion process, *Food Chemistry* **86**, 195-202.
- Park, Y. G., S. J. Kim, H. Y. Jung., Y. M. Kang, S. M. Kang, D. T. Prasad., S. W. Kim, and M. S. Choi (2004), Variation of Ginkgolides and Bilobalide Contents in leaves and cell cultures of *Ginkgo biloba* L., *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **9**, 35-40.
- Matsumoto, T. and T. Sei (1987), Antifeedant activities of *Ginkgo biloba* L. components against the larva of *Pieris rapae crucivora*, *Agric. Biol. Chem.* **51**, 249-250.
- 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, *Kor. J. Pesticide Science* **5**(1), 24-29.
- Mazzanti, G., M. T. Mascellino., L. Battinelli., D. Coluccia., M. Manganaro, and L. Saso (2000), Antimicrobial investigation of semipurified fractions of *Ginkgo biloba* leaves, *J. Ethnopharmacology* **71**, 83-88.
- Chung, H. J. (2000), Antioxidative and antimicrobial activities of *O. punitiaeficus* indica var. saboten, *Kor. J. Soc. Food. Sci.* **16**(2), 164-169.
- Park, S. K., J. R. Park, S. W. Lee, K. I. Seo, S. K. Kang, and K. H. Shim (1995), Antimicrobial activity and heat stability of water-pretreated extract of leaf mustard dolsan (*Brassica juncea*), *J. Kor. Soc. Food. Nutr.* **24**(5), 710-715.
- Kang, S. K. (1995), Isolation and Antimicrobial activity of antimicrobial substance obtained from leaf mustard (*Brassica juncea*), *Kor. J. Food. Sci. Technol.* **24**(5), 697-698.
- Ryu, Y. J. (2003), Antimicrobial characteristic of *Gardenia jasminoides* extract (M. S. Thesis), Dept. of environmental Biotechnology, Gyeongsang National University, Gyeongsang.