

비듬유발균 (*Pityrosporum ovale*)에 대한 은행잎으로부터 추출한 Ginkgolide 및 Bilobalide의 항진균 효과

이인화^{1*} · 김미진¹ · 최준호¹ · 최승현²

¹조선대학교 환경공학과 BK21 바이오가스기반 수소생산 전문인력양성팀, ²(주)식물나라

Antifungal Effect of Bilobalide and Ginkgolide Extracted from Leaves of *Ginkgo biloba* Against *Pityrosporum ovale*

In-Hwa Lee^{1*}, Mi-Jin Kim¹, Jun-Ho Choi¹, and Seung-Hyun Choi²

¹Department of Environmental Engineering, BK21 Team for Biohydrogen Production, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

²Phytoworld Co., Ltd. Chonnam 517-803, Korea

Abstract Antifungal effect of *Ginkgo biloba* leaves extracts conducted for *Pityrosporum ovale*. Antifungal effect verified by diffusion test, optical density test and colony counting test under various concentration. Extract of ginkgo biloba leaves performed with 40% ethanol and 60% water solution at 60°C and major components analyzed by HPLC. The concentrated extract have bilobalide and ginkgolide A and ginkgolide B and their concentration were 153.0 mg/L, 8403.5 mg/L and 2723.0 mg/L respectively. *Ginkgo biloba* leaves extracts gave 99.1% of antifungal effect for *Pityrosporum ovale* examined by colony counting method.

Keywords: *Ginkgo biloba* leaves extract, *Pityrosporum ovale*, bilobalide and ginkgolide, antifungal effect

서 론

비듬은 비듬사상균이 원인이 되는 피부병으로 두피가 건조해지면서 각질이 일어나 가렵음을 수반하기도 하며 [1,2], 특히 모발에 기름이 많고 두피에 피지 분비량이 많은 지루성 비듬은 모발에 먼지가 잘 흡착되어 발생하는 것으로 확실한 원인은 밝혀지지 않고 있다.

두피에는 한선과 피지선이 널리 분포되어 미생물이 번식하기 좋은 환경으로 미생물이 상주하고 있다. 주요 상주 미생물 (resident microflora)은 3개 균으로 혐기성균, 호기성구균과 진균인 *Malassezia*가 있다 [3]. 비듬은 이러한 정상적인 세균중 하나인 *Malassezia*가 남성 호르몬이 분비되는 사춘기 이후에 두피와 같은 지루부위에서 상존하기 시작하면서

생기게 된다. 정상적인 경우 *Malassezia*는 지루부위에 상존하여 정상균총의 46% 정도를 차지하게 된다. 그러나 기후, 땀, 음식 등의 환경적인 요인과 스트레스 등의 생리적인 요인에 의해서 *Malassezia*가 과다하게 증식하게 되면서 정상균총의 74%가 넘을 경우 비듬이 생기기 시작하고 83% 이상 높아질 경우 지루성 피부염으로 발병하게 된다 [4].

1874년 프랑스에서 처음으로 비듬의 원인이 비듬균일 것이라는 학설이 제기되었다 [5]. 그 후 1984년 비듬균으로 *Pityrosporum ovale*가 명시되었으나 [2], 1986년 *Pityrosporum ovale*라는 명칭은 동인한 효모균에서 비롯된 균사상 진균 *Malassezia furfur*의 명명시기가 앞서는 이유로 그 속에 통합되어 *M. furfur*가 적합한 균명으로 인정되었다. 최근에는 *M. furfur*로부터 *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtuse*, *M. restricta* 그리고 *M. slooffiae* 등 5개 균종으로 분리 분류되어 *M. furfur*가 차지하는 범위가 축소되었다 [6].

비듬 치료에 사용되는 약이나 제제에는 zincpyrithione [7], piroctoenolamine, ketoconazole, sulfur, tar, seleniumsulfide

*Corresponding author

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

e-mail: ihlee@chosun.ac.kr

등과 같은 화학물질이 항균제로 함유되어 있다 [4]. 이들 항진균제는 모두 정균작용에 따라 항진균 효과를 나타내기 때문에 장기적인 투여를 요하게 되어 간장 및 신장독성유발, 두통 및 피부과민 반응 등의 부작용이 나타나고 치료가 끝난 후에도 재발되기 쉬운 문제점을 갖고 있다 [8]. 이러한 화학물질은 적은 양으로도 우수한 항균력을 가지고 있어 현재 그 사용이 보편화되고 있다. 그러나 이들 화학물질은 안전성에 대한 우려가 있어 사용이 제한되거나 일부 국한되어 있으며 [9], 이러한 물질이 지속적으로 축적될 경우 만성 독성, 발암성, 돌연변이 유발 등 그에 따른 부작용이 발생할 수 있는 것으로 알려져 있다 [10].

은행잎의 항균 성분에 대한 연구는 주로 외국에서 기초적인 연구로 진행되어 왔다[11-13]. 은행잎에 함유된 물질은 수십 종이 알려져 있으며 테르펜류인 *ginkgolide*, *bilobalide* 등이 신경계 질병을 치료하는데 일부 이용되고 있으며, flavoneglycoside인 *zincomine*이 혈액청정제로 상품화되었다 [14-16]. 유럽지역에서는 현재 은행잎 엑기스 제제 (정제, 액제, 좌제, 주사제 등)의 단미제 및 복합제로 사용되고 있으며, 이에 대한 화학적, 약리학적, 임상학적인 연구가 전 세계적으로 활발히 진행되고 있다 [17-21].

본 연구에서는 은행잎 추출물이 항균효과가 확인된 바 [21], 항진균 작용이 있음을 확인하고 향후 항균 및 항진균 작용을 갖는 세계 첨가물로 제공하고자 한다. 균주로서 대표적인 비듬유발균인 *Pityrosporum ovale*을 선택하여 은행잎 추출방법과 추출물의 농도에 따른 영향을 항균작용이 있는 *ginkgolide* 및 *bilobalide*를 중심으로 항진균 효과를 검증하고자 한다.

재료 및 방법

시료제조

본 실험에서 사용한 은행잎은 9월 하순과 10월 중순에 채취하여 증류수로 수세한 후 음지에서 풍건시켜 완전히 건조된 것을 믹서를 이용하여 분말로 제조하였다. 은행잎 분말 100 g을 40% 에탄올 1 L에 넣은 후 80°C에서 4시간 동안 추출하여 증탕한 후 rotary vacuum evaporator (BUCHI-V-800, R205, B-490, Vacv-500)로 농축하였다.

균주 및 배지

비듬유발 균주는 *Pityrosporum ovale* (ATTC 12078)로 한국중균협회에서 분양받아 *pityrosporum medium* (PM, pH 7.0 24°C)에서 24시간 진탕 배양하였다. 실험 균주 배양용 배지로는 실험 Potato Dextrose Broth와 Ox Gall Powder가 함유된 PDA배지를 사용하였고 희석액으로는 K_2HPO_4 와 KH_2PO_4 가 함유된 phosphate buffer를 autoclave를 이용하여 고압 멸균한 후 사용하였다.

Table 1. Composition of Potato Dextrose Broth medium

Components	weight
Potato Dextrose Broth	24 g
Ox Gall Powder	24 g
Agar	24 g
Distilled water	1.0 L

Composition of *pityrosporum meidium*

Components	weight
Malt Extract Agar	60.0 g
Ox-bile (desiccated)	20.0 g
Tween 40	10.0 g
Glycerol mono-oleate,	2.5 g
Distilled water	1.0 L

Composition of phosphate buffer

Components	weight
K_2HPO_4	6 g
KH_2PO_4	2 g
Distilled water	1.0 L

실험방법

은행잎 추출물을 농축조건별 항진균력을 확인하기 위하여 100 g 은행잎분말을 1 L에서 추출한 추출물을 기준으로 원액 대비 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 및 1/64로 농축하여 디스크확산법 (disc diffusion test), 광화학적 탁도법 (optical density test) 그리고 colony counting test법을 이용하였다.

성분분석

HPLC를 이용하여 *Pityrosporum ovale*에 대한 항진균 효과를 나타내는 생리활성 성분을 분석하였다. HPLC의 분석조건은 Table 2와 같으며, 분석에 사용된 대조물질은 Sigma사로부터 *bilobalide*와 *ginkgolide A, B*의 표준시약으로 구입하여 사용하였으며, 10 mg씩 칭량하여 ethylacetate 10 mL에 용해시킨 용액을 stock solution으로 하고 5 µg/mL로 조제한 후 20 µL씩 주입하여 chromatogram을 얻었다.

Table 2. Quantitative HPLC method in *Ginkgo biloba* leaves extract

Analytical instrument	HPLC (German sykam: S 7131 reagent organizer, S2100 solvent delivery system, S 520 sample inject or S 3240 UV/VIS multichannel detector)
Detection	UV 219 nm
Column	Luna 5µm C18(2) 250 × 4.60 mm
Flow rate	1 /min
Mobil phase	H ₂ O : THF : MeOH = 68.5 : 10.5 : 1
Injection Volume	20 µL

결과 및 고찰

은행잎 추출물 농축별 디스크 확산법 (Diffusion test)

*Pityrosporium ovale*를 30°C에서 1~2일 배양한 후 이 균액을 배지 1 mL당 1×10^6 cell이 포함되도록 집중하여 현탁하였다. 이 균체를 도말한 soft agar를 충분히 건조시킨 후 paper disc를 무균 조작에 의해 안착시켰고, 그 위에 각종 추출물 용액을 100 μ L씩 주입하여 도말한 균체의 최적 생육온도에서 24시간 배양한 후 증식저지환의 유무로 그 활성을 검색하였다. 은행잎 추출물을 원액의 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 및 1/64로 농축하여 disc diffusion test 결과 각각 1.25 cm, 1.25 cm, 1.3 cm, 1.8 cm, 2.0 cm, 2.5 cm의 증식 저지환을 형성하였다. 이러한 은행잎 추출물의 농축별 항진균력 실험 결과, 은행잎 추출물의 농도가 높으면 높을 수록 더 큰 항진균력을 보여줌으로써 은행잎 추출물은 농도 의존성이 큰 것으로 나타났다.

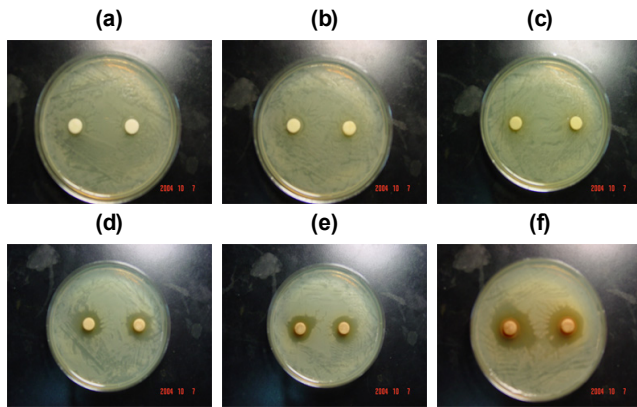


Fig. 1. Antimicrobial effect of the concentrated of *Ginkgo biloba* leaves extracts on *Pityrosporium ovale* by the disc diffusion test; (a) 1/2, (b) 1/4, (c) 1/8, (d) 1/16, (e) 1/32, (f) 1/64.

은행잎 추출물 농축별 광화학 탁도 측정법 (Optical density test)

Potato Dextrose Broth 10 mL에 *Pityrosporium ovale* 0.1 mL과 각각의 은행잎 추출물을 집중하고 shaking incubator에서 최적 생육조건으로 배양시킴과 동시에 접종 시간부터 4시간 간격으로 spectrophotometer (UV-2401PC, shimazu)로 640 nm에서 측정하였다. 그 결과 무처리한 균은 최대 흡광도 1.2까지 성장하였으나 추출물 원액의 1/2와 1/4로 농축한 은행잎 추출물은 0.15, 1/8에서 1/64로 농축한 은행잎 추출물을 사용했을 경우 균의 성장이 나타나지 않았다. 이 결과로부터 은행잎 추출물은 농도가 증가할수록 균의 성장 억제 효과가 증가하는 농도 의존성을 가지고 있는 것을 확인할 수 있었다. 실제 은행잎 추출물을 세제에 첨가하여 비듬억제 효과를 얻기 위해서는 은행잎 추출물을 적어도 1/16이상 농축하는

것이 요구된다.

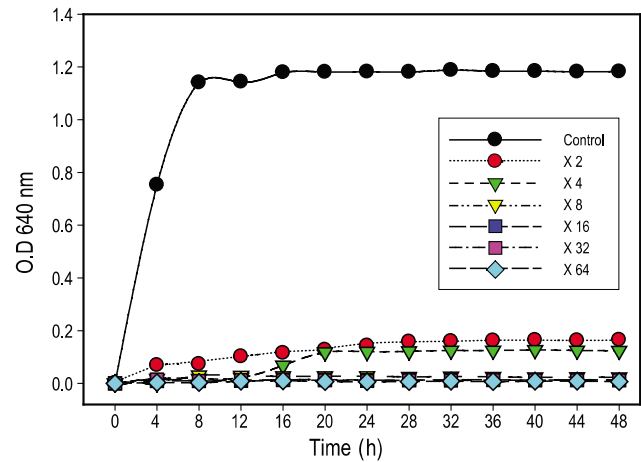
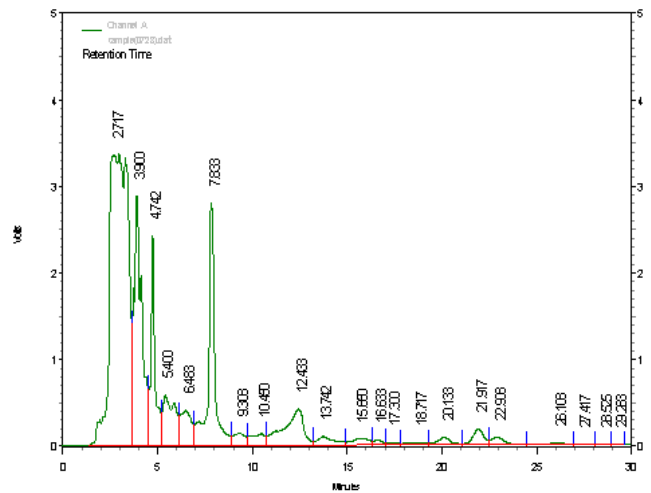


Fig. 2. The Antimicrobial effect of the concentrated of *Ginkgo biloba* leaves extract on *Pityrosporium ovale* by the optical density test.

은행잎 추출물 유효성분 분석

은행잎 추출 중 항균 및 항진균력이 있는 bilobalide와 ginkgolide A, B의 함량을 HPLC로 분석하였다. Fig. 3에서와 같이 은행잎 분말 100 g을 40% ethanol 1 L에 넣은 후 80°C에서 4시간 동안 rotary vacuum evaporator 이용하여 증탕한 후 1/16까지 농축하여 시료로 사용하였다. 이때 HPLC를 이용하여 bilobalide와 ginkgolide A, B 함량을 분석한 결과 각각 2153.0 mg/L, 8403.5 mg/L, 2723.0 mg/L 이었다.



Name	Retention Time	Area	ESTD concentration
bilobalide	10.450	4368056	2153.026 (mg/L)
ginkgolide A	12.433	25273858	8403.48 (mg/L)
ginkgolide B	15.650	5127783	2722.957 (mg/L)

Fig. 3. The results of HPLC analysis containing *Ginkgo biloba* leaves extract.

Colony counting test

비듬 유발균 *Pityrosporum ovale*의 항진균작용을 colony counting test를 이용하여 측정하였다. 연속희석법을 사용하여 *Pityrosporum ovale*를 2×10^4 cell 이 되게 하고 은행잎 추출물을 첨가하여 PM 배지에 도말하고 이 배지를 최적생육조건에서 1~2일 배양하여 colony 수를 비교하였다.

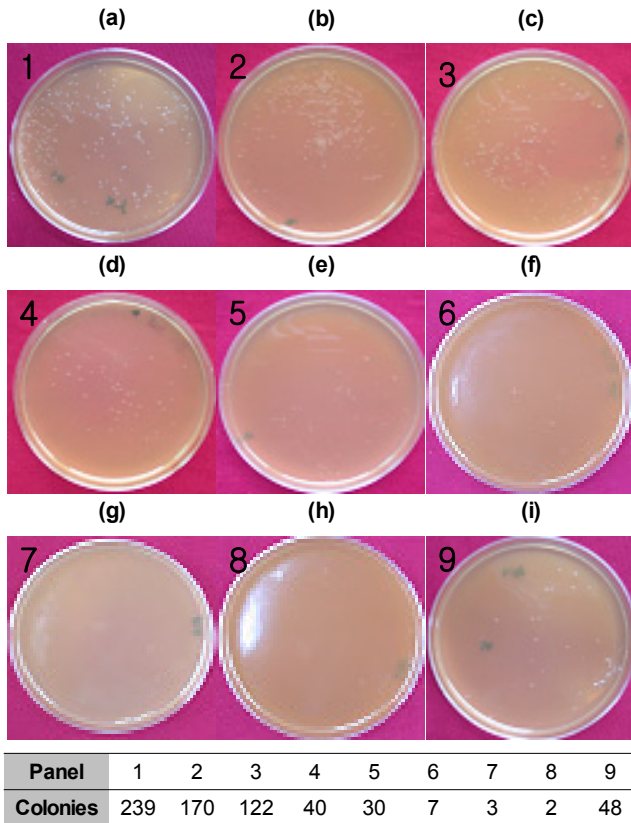


Fig. 4. Antifungal activities of BB, GA and GB for *Pityrosporum ovale* treated as follows; (panel 1; non treated, panel 2; BB; 0.215 GA; 0.840, GB; 0.272, panel 3; BB; 0.430, GA; 1.680, GB; 0.544, panel 4; BB; 0.645, GA; 2.520, GB; 0.861, panel 5; BB; 0.860, GA; 3.360, GB; 1.088, panel 6; BB; 1.075, GA; 4.200, GB; 1.360, panel 7; BB; 1.290 GA; 5.040, GB; 1.632, panel 8; BB; 1.505, GA; 5.880, GB; 1.904, panel 9; ketoconazole; 1.8) (Unit; mg/mL) ※ BB; bilobalide, GA; ginkgolide A, GB; ginkgolide B.

그 결과 은행잎 추출물 100 mg/mL (bilobalide; 0.215 mg ginkgolide A; 0.840 mg, ginkgolide B; 0.272 mg)에서는 28.8%, 200 mg/mL (bilobalide; 0.430 mg, ginkgolide A; 1.680 mg, ginkgolide B; 0.544 mg)에서는 48.9%, 300 mg/mL (bilobalide; 0.645 mg, ginkgolide A; 2.520 mg, ginkgolide B; 0.816 mg)에서는 83.3%, 400 mg/mL (bilobalide; 0.860 mg, ginkgolide A; 3.360 mg, ginkgolide B; 1.088 mg)에서는 87.4%, 500 mg/mL (bilobalide; 1.075 mg, ginkgolide A; 4.200 mg, ginkgolide B; 1.360 mg)에서는 97.0%, 600 mg/mL

(bilobalide; 1.290 mg, ginkgolide A; 5.040 mg, ginkgolide B; 1.632 mg)에서는 98.7%, 700 mg/mL (bilobalide; 1.505 mg, ginkgolide A; 5.880 mg, ginkgolide B; 1.904 mg)에서는 대조군에 비하여 사멸율이 99.1%로 나타났다. 양성대조군으로 쓰인 ketoconazole은 1800 mg/mL에서 79.9%로 나타났다. 즉 700 mg/mL을 투여한 은행잎 추출물의 항진균효과가 ketoconazole은 1800 mg/mL을 투여한 ketoconazole 더 19.2%의 항진균력이 증가함을 확인할 수 있었다.

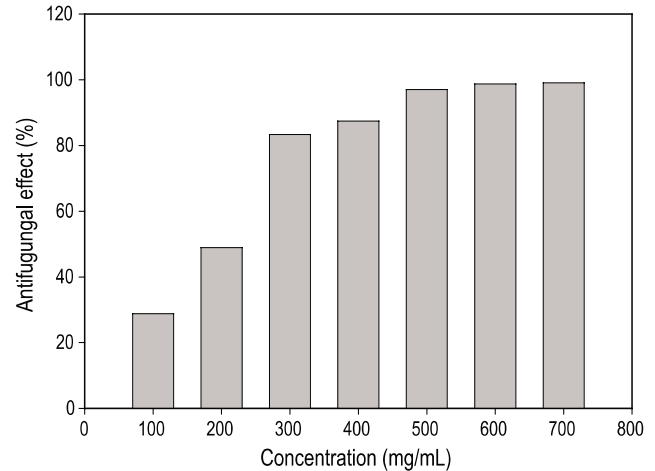


Fig. 5. Antifungal activities of BB, GA and GB for *Pityrosporum ovale*. When the concentration of BB, GA and GB increased, the antifungal activities also increased as follows; 100 mg/mL (BB; 0.215 mg GA; 0.840 mg, GB; 0.272 mg) 28.8%, 200 mg/mL (BB; 0.430 mg, GA; 1.680 mg, GB; 0.544 mg) 48.9%, 300 mg/mL (BB; 0.645 mg, GA; 2.520 mg, GB; 0.816 mg) 83.3%, 400 mg/mL (BB; 0.860 mg, GA; 3.360 mg, GB; 1.088 mg) 87.4%, 500 mg/mL (BB; 1.075 mg, GA; 4.200 mg, GB; 1.360 mg) 97%, 600 mg/mL (BB; 1.290 mg, GA; 5.040 mg, GB; 1.632 mg) 98.7%, 700 mg/mL (BB; 1.505 mg, GA; 5.880 mg, GB; 1.904 mg) 99.1%.

농축비율에 따른 항진균 효과

Fig. 6은 농축비율에 따른 *Pityrosporum ovale*에 대한 항진균효과를 나타낸 결과이다. Potato Dextrose Broth 100 mL에 *Pityrosporum ovale* 1 mL과 은행잎 추출물 1/16 농축을 16 mL, 1/128 농축을 2 mL 접종하고 shaking incubator에서 최적 생육조건으로 배양시킴과 동시에 접종 시간부터 4시간 간격으로 spectrophotometer로 660 nm에서 측정하였다. 이 실험 결과로 볼 때 무처리한 *Pityrosporum ovale*의 성장은 최대 흡광도 1.2까지 나타냈으나, 추출 원액의 1/16 농축과 1/128 농축의 은행잎 추출물을 첨가한 경우 비듬균은 흡광도가 0.6 미만의 성장억제를 보였다. 이러한 농축 추출물을 세제에 첨가하고자 할 때는 농축된 추출물을 사용하는 것이 항진균력을 높이는데 유리하고 세제의 부피를 줄이는데 기여할 것으로 사료된다.

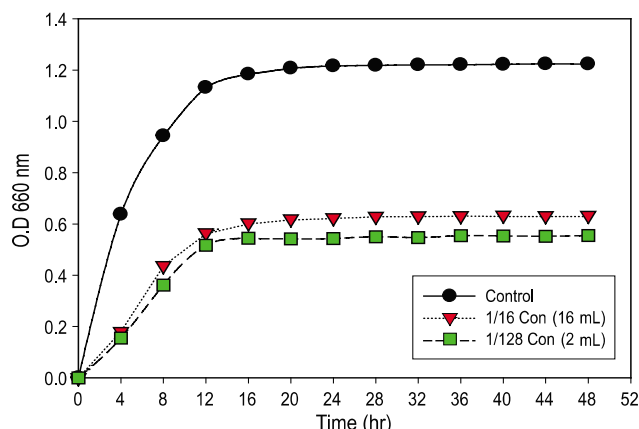


Fig. 6. The antimicrobial effect of 1/16 concentration (16 mL) and 1/128 concentration (2 mL) of *Ginkgo biloba* leaves extract on *Pityrosporum ovale* by the optical density test.

결론

100 g 은행잎분말을 1 L에서 추출한 추출물을 기준으로 원액 대비 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 및 1/64로 농축하여 사용하였으며 농축하기 전 추출원액을 HPLC로 분석한 결과 bilobalide와 ginkgolide A, B 함량이 각각 2153.026 mg/L, 8403.48 mg/L, 2722.957 mg/L 이었다. 비듬유발 균주로 *Pityrosporum ovale* (ATTC 12078)를 pityrosporum medium (PM, pH 7.0, 24°C)에서 24시간 진탕 배양하여 디스크확산법 (disc diffusion test), 광화학적 탁도법 (optical density test) 그리고 colony counting test법을 이용하여 항진균력을 실험한 결과 은행잎 추출물은 농도가 증가할수록 균의 성장 억제 효과가 증가하는 농도 의존성을 가지고 있는 것을 확인할 수 있었다. Optical density test 결과로부터 실제 은행잎 추출물을 세제에 첨가하여 비듬억제 효과를 얻기 위해서는 은행잎 추출물을 적어도 1/16이상 농축하는 것이 요구된다. Colony counting test 결과 은행잎 추출물 원액 700 mg/mL을 투여한 경우 (bilobalide; 1.505 mg, ginkgolide A; 5.880 mg, ginkgolide B; 1.904 mg) 사멸율이 99.1%로 나타났으며 양성대조군으로 쓰인 ketoconazole은 1800 mg/mL에서 79.9%로 나타났다. 700 mg/mL을 투여한 은행잎 추출물의 항진균 효과가 1800 mg/mL투여한 ketoconazole 보다 19.2%의 항진균력이 증가함을 확인할 수 있었다.

감사

이 연구는 조선대학교 2004년도 교내연구비에 의해 지원되었으므로 이에 감사드립니다.

접수 : 2009년 12월 30일, 게재승인 : 2010년 4월 20일

REFERENCES

- Seo, S. B., S. R. Jung, and S. H. Oh (1990) Distribution of causative fungi in home environment of patients with tinea capitis caused by *Microsporum canis*. *Korean J. Dermatol.* 28: 165-173.
- Hang, S. O. (2002) Tinea capitis in a postmenopausal woman. *Korean J. Dermatol.* 38: 556-558.
- McGinley, K. J., J. J. Leyden, and R. R. Marples (1979) Quantitative microbiology of the scalp in non-dandruff, dandruff and seborrheic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 64: 401-405.
- Lee, H. K. (2003) *A Study on the Effect of Natural Essential Oil in Dandruff Germ*. A Master's Thesis. University of Yongin, Korea.
- Jung, H. J., D. W. Kim, J. B. Jun, and S. L. Chung, (1993) Statistical and mycologic studies on dandruff. *Korean J. Dermatol.* 31: 164-174.
- Textbook Compilation Committee (2001) *Dermatology*. Korean Dermatological Association. p. 325. Yeomongak Press, Korea.
- Lee, K. J. and J. M. Kwon (1998) Antimicrobial activity of zirconium pyrithione complex. *Korean J. Pharm. Sci.* 18: 107-111.
- Jang, S. Y., S. Y. Ryu, and S. D. Kim (2003) Antifungal activity of plant extracts against *Pityrosporum ovale* and *Candida albicans*. *Kor. J. Pharmacogn.* 34: 303-307.
- Nelson, J. D. and G. A. Hyde (1981) Sodium and zinc omdine antimicrobials as cosmetic preservative. *Cosmetics Toiletries* 96: 87-90.
- Lin, C. C. S. and D. Y. C. Fung (1983) Effect of BHA, BHT, TBHQ and PG on growth and toxigenesis of selected *Aspergilli*. *J. Food Sci.* 48: 578-583.
- Mazzanti, G., M. T. Mascellino, L. Battinelli, D. Coluccia, M. Manganaro, and L. Saso (2003) Antimicrobial investigation of semipurified fractions of *Ginkgo biloba* leaves. *J. Ethnopharmacol.* 71: 83-88.
- Boonkaew, T. and N. D. Camper (2005) Biological activities of ginkgo extracts. *Phytochemistry* 12: 318-323.
- Huang, X., W. J. Xie, and Z. Z. Gong (2002) Characteristics and antifungal activity of a chitin binding protein from *Ginkgo biloba*, *FEBS Letters* 478: 123-126.
- Jaracz, S., S. Malik, and K. Nakanishi (2004) Isolation of ginkgolides A, B, C, J and bilobalide from *G. biloba* extracts. *Phytochem.* 65: 2897-2902.
- Tang, C., X. Wei, and C. Yin (2003) Analysis of ginkgolides and bilobalide in *Ginkgo biloba* L. extract injections by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 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. Chromatogr. A.* 986: 121-127.
17. Cheung, F., Y. L. Siow, and O. Karmin (2001) Inhibition by ginkgolides and bilobalide of the production of nitric oxide in macrophages (THP-1) but not in endothelial cells (HUVEC). *Biochem Pharmacol.* 61: 503-510.
 18. Arredondo, M. F., F. Blasina, C. Echeverry, A. Morquio, M. Ferreira, J. A. Abin-Carriquiry, L. Lafon, and F. Dajas (2004) Cytoprotection by achyrocline satureioides (Lam) D.C. and some of its main flavonoids against oxidative stress. *J. Ethnopharmacology* 91: 13-20.
 19. Kim, S. I., C. Park, M. H. Oh, H. C. Cho, and Y. J. Ahn (2003) Contact and fumigant activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobiidae). *J. Stored Prod. Res.* 39: 11-19.
 20. Suzuki, R., H. Sugie, K. Sasaki, T. Yoshimura, K. Wada, and T. Tanaka (2004) Preventive effects of extract of leaves of ginkgo (*Ginkgo biloba*) and its component bilobalide on azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Cancer Lett.* 210: 159-169.
 21. Chen, Y. S., C. J. Liu, C. Y. Cheng, and C. H. Yao (2004) Effect of bilobalide on peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 25: 509-514.
 22. Lee, I. W., S. Yoon, S. H. Choi, J. Y. Park, S. Y. Han, J. Y. Song, and S. J. Yoon (2006) A study in the antimicrobial effect of *Ginkgo biloba* leaves extracts according to concentration of ethanol for *Staphylococcus aureus*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 21: 312-316.