

## 은행 외종피로부터 살선충 물질의 순수 분리와 활성\*

장유주\*\* · 황현정\*\*\* · 김근기\*\*\*\*

Purification Nematicidal Substance and Nematicidal Activity from *Ginkgo biloba* L. Outer Seedcoat

Jang, Yu Ju · Hwang, Hyeon Jeong · Kim, Keun Ki

Plant parasitic nematodes are causing significant damage in crop production. There is a need to develop eco-friendly nematicide that reduces the damage of nematode and has little effect on the environment and human. In this study, we have isolated a substance having nematicidal activity from *Ginkgo biloba* L. outer seedcoat. Studies of *G. biloba* L. outer seedcoat are insufficient compared to the seed and leaves due to their odor and toxicity. The dried *G. biloba* L. outer seedcoat was extracted with dichloromethane:methanol (1:1) and fractionated into hexane, ethyl acetate and H<sub>2</sub>O. Four steps TLC were performed from EtOAc fraction to purely isolate GB4-3 with nematicidal activity. To compare nematicidal activity, *G. biloba* L. seedcoat methanol extract and purified GB4-3 were investigated in terms of treatment concentration and time. As a result, the nematicidal activity increased with concentration and time. In the place treated with 20 µg/mL of crude *G. biloba* L. seedcoat MeOH extract, strong activity appeared after 12 hours, and 46% nematicidal activity shown after 18 hours. About 69% of nematicidal activity was confirmed in the place where GB4-3 purified from outer seedcoat was treated with 20 µg/mL, and the possibility of development as nematicide was very high. This study could be used as a basic data for the development of a nematode preparation from *G. biloba* L. outer seedcoat.

Key words : *ginkgo*, *isolation*, *nematicide*, *nematode*, *outer seedcoat*

\* 이 과제는 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

\*\* 고려대학교 생명과학대학 식물생명공학과 대학원 박사과정

\*\*\* 부산대학교 생명자원과학대학 생명환경화학학과 학부과정

\*\*\*\* Corresponding author, 부산대학교 생명환경화학학과, 생명산업융합연구원 교수(kkkim@pusan.ac.kr)

## I. 서 론

토양에 서식하는 선충류는 재배식물의 근권에 서식하고, 크기는 0.1~5 mm로 다양하며, 선충류는 이동성과 서식지에 따라 분류를 한다. 이동성에 의해서는 정주형과 이동형으로 분류할 수 있고, 서식지에 따라서는 식물체 내에 서식하는 것과 토양 중에 서식하는 종류로 분류한다. 선충의 피해는 뿌리 섭식과 식물체 내로 침입할 때 생기는 섭식병변을 따라 세균이나 곰팡이 감염으로 잎의 황변과 성장장애 등의 피해가 더욱 악화될 수 있으며, 일부 선충은 식물병원성 바이러스의 매개체 역할을 하게 된다. 이러한 선충에 의한 재배작물의 피해를 막기 위해서 생물학적 방제, 물리적 방제, 화학적 방제 및 경종적 재배법 등이 있다. 생물학적 방제는 세균, 곰팡이, 곤충 그리고 포식성 선충을 이용한 환경 친화적인 방제가 다양하게 시도되고 있다(Spiegel et al., 1991; Siddiqui and Mahmood, 1999; Abo-Elyousr et al., 2019). 토양개량, 담수, 열수처리 및 태양열 소독 등을 이용한 물리적인 방법을 이용할 수 있으나, 비용이나 작기 중에는 적용이 어렵다. 윤작이나 전답윤작 등과 같은 경종적 방제법을 사용할 수 있지만 재배시기 조절 및 인력과 시간 등의 제약으로 실질적 사용은 제한적이다(Lim et al., 2004; Zhu et al., 2005). 화학적 방제제는 작물에 피해를 유발하여 사용 시기에 제한이 있고, 비용이 고가이며, 환경생태계에 부하가 있어 사용에 문제점이 있다(Kim and Choi, 2001; Atkins et al., 2003). 그러므로 사용시기와 금액적인 부분 등을 고려했을 때 작기 중에도 사용할 수 있어야 하고, 환경적 부하도 적고 경제적인 부담도 경감시킬 수 있는 생물학적 방제나 친환경적 방제법으로 선충개체를 조절할 필요가 있다. 토착생물 자원 유래의 천연물을 이용하는 방제법 개발은 현장적용에 큰 장점이라 할 수 있다. 선충 방제제 선발연구에 배양의 용이성과 안정적 공급 등으로 *Rhabditis* sp.를 이용하고 있으며(Kim et al., 2014), *Rhabditis* sp.에 살선충 활성을 갖는 물질들은 식물기생 선충들에 대해서도 유의적인 살선충 활성을 나타냈다(McGaw et al., 2007; Choudhary, G. P., 2013; Kim et al., 2014; Katarzyna et al., 2020).

우리나라에서는 은행나무를 가로수와 경제수로 심어왔으며, 잎과 종자는 약재 원료로 사용하고 있다. 잎 추출물로부터 물질 분리, 동정과 활성연구가 보고되어 있으며, diterpene trilactone류의 ginkgolide A, B, C, J 및 bilobalide는 항산화 활성과 살충 활성(Yang et al., 2001; Lee et al., 2005; Han and Kim, 2014) 및 항균 활성도 보고되었다(Lee et al., 2006). 종자는 백과라는 생약명으로 기관지천식이나 알코올로 인한 이상지질혈증(Yao et al., 2007) 등의 치료에 이용해왔다. 유럽에서는 뇌기능 부전, 집중력장애, 우울증, 현기증, 두통 등에 은행추출물을 사용해 왔다(Leistner and Drewke, 2010). 은행열매의 외종피에는 항산화와 항균 활성이 있지만(Soholm, 1998), 알레르기를 유발하는 ginkgotoxin (Leistner and Drewke, 2010)과 고약한 냄새 때문에 재배와 수확을 기피하고 있다. 작물병해충에 대한 외종피 연구는 MeOH 추출물의 파밤나방유충 억제활성과 ginkgolic acid의 살비활성 보고는 있으나(Pan

et al., 2006; So et al., 2012), 아직 살선충 활성화에 대한 보고는 없다.

본 연구에서는 은행 외종피 추출물로부터 부식선충에 대한 살선충 활성을 조사하고, 살선충 활성물질의 순수분리 방법과 친환경 선충방제제 개발의 참고자료로 제공하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험재료

본 실험에 사용한 *G. biloba* L. 열매를 경남 합천지역에서 채취한 후 종자는 분리하고, 외종피를 음건하여 사용하였다. 건조한 외종피는 냉장 보관하면서 추출시료로 사용하였다.

살선충 활성을 위해 사용한 부식선충(*Rhabditis* sp.)은 부산대학교 생명산업융합연구원 선충연구센터에서 분양받았다. 부식선충은 nematode growth media (NGM) agar plate를 제조하여 공생균과 같이 접종하여 배양하였다. NGM 배지에 부식선충을 접종한 다음 25°C에서 7일간 배양한 후 증류수를 이용하여 25  $\mu\text{m}$  sieve를 통과시켜 분리하였다. 증류수로 분리한 부식선충은 시험관에 넣은 후 냉장 보관하며 실험에 이용하였다.

### 2. 물질추출

물질추출을 위해 냉장 보관 중이던 은행 외종피를 분쇄기로 분쇄하여 실험에 사용하였다. 분쇄한 외종피에 dichloromethane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ):methanol (MeOH) 혼합용매를 중량의 5배로 넣고, 200 rpm, 2시간 진탕 추출하였다. 추출은 3회 반복하였으며, 상등액을 filter paper (5C, 110, Advantech, Japan)로 여과하고, 진공 농축기로 농축하였다. 농축물을 이용하여 용매의 용해도에 따라 분획을 하고자  $\text{H}_2\text{O}$ 를 첨가하여  $\text{H}_2\text{O}$  용해물을 얻고, 잔류물에 hexane을 첨가하여 hexane 용해물을 얻었으며, 또다시 잔류물에 ethyl acetate (EtOAc)를 첨가하여 EtOAc 용해물을 확보하고, 각 용해물을 농축하였다. 각 농축물은 냉장 보관하며 살선충 활성을 조사하였다. 이후 활성물질을 분리하기 위한 시료로 사용하였으며, 단계마다 활성조사를 실시하였다(Fig. 1).

### 3. 물질분리

부식선충에 대한 살선충 활성을 나타내는 물질을 분리하기 위하여 총 4차에 걸쳐 thin layer chromatography (TLC)를 실시하였다. TLC 전개 후 UV lamp를 이용하여 물질을 확인하고,  $R_f$  값에 따라 물질을 회수하였으며, 회수한 각  $R_f$  값의 물질을 부식선충에 처리하여

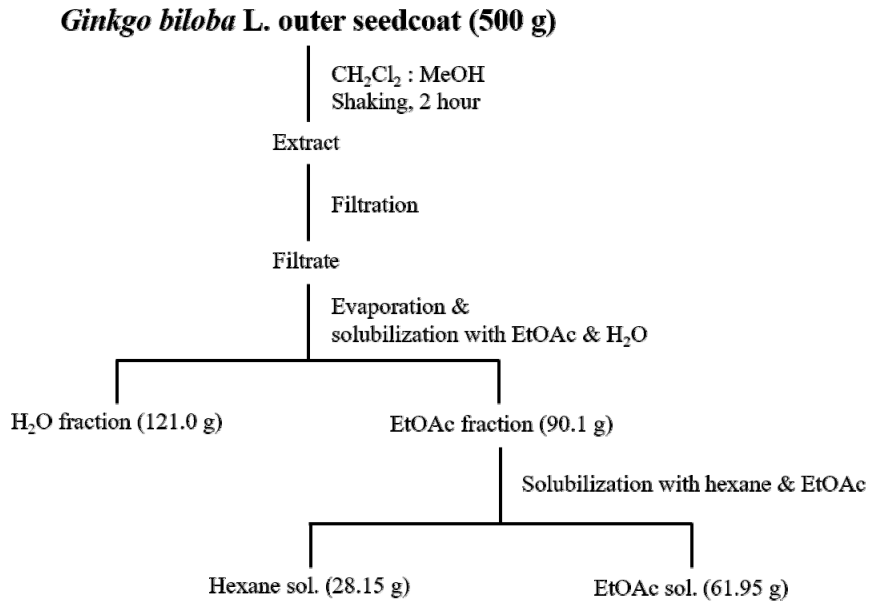


Fig. 1. Schematic diagram of solvent extraction process of *G. biloba* L. outer seedcoat.

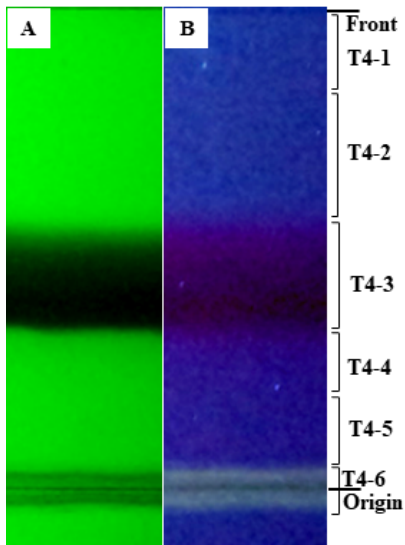


Fig. 2. The 4<sup>th</sup> TLC separation pattern of the 3<sup>rd</sup> TLC  $R_f$  0.58 compounds.

A: UV-254 nm photograph,

B: UV-365 nm photograph.

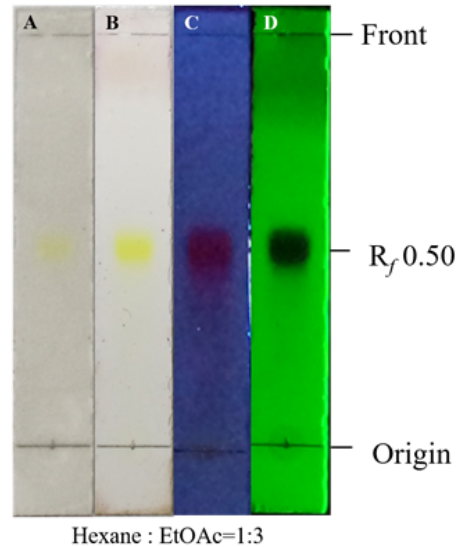


Fig. 3. Confirmation the degree of separation of T4-3 with prep-TLC.

A: Visible photograph, B: Sulfuric acid spray

photograph, C: UV-365 nm photograph, D:

UV-254 nm photograph.

살선충 활성을 조사하였다. 살선충 활성이 있는 물질을 다음 분리과정에 이용하는 방법으로 분리를 실시하였다. 1차 TLC는 silicagel TLC plate (200 × 200 × 1 mm, Silica gel 60 GF<sub>254</sub>, Merck)를 만들어 사용하였고, 이동상으로 Hexane : EtOAc (1:4)의 용매조건으로 전개시켰다. 물질의 전개패턴을 확인한 후 각 band를 T1-1~T1-6으로 명명하고, 회수하여 살선충 활성에 이용하였다. 1차 TLC에서 R<sub>f</sub> 0.22~0.56의 물질에서 가장 높은 살선충 활성이 확인되어, 2차 TLC 시료로 사용하였다. 2차 TLC는 hexane : EtOAc (1:5) 조건으로 전개하여 살선충 활성을 조사한 결과, R<sub>f</sub> 0.06~0.31 물질에서 가장 높게 나타나, 3차 TLC 시료로 사용하였다. 3차 TLC는 hexane : EtOAc (2:3) 조건으로 전개하였으며, R<sub>f</sub> 0.58 물질에서 가장 높은 살선충 활성이 나타났고, 물질분리도가 높았으나 불순물의 함유를 확인하고자 4차 TLC를 실시하였다. 4차 TLC는 hexane : benzene : EtOAc (1:1:3) 조건으로 실시하여 순수한 물질을 얻었다 (Fig. 2). 순수분리 정도와 불순물의 함유를 확인하기 위하여 prep-TLC를 실시하고, 황산발색과 UV lamp (254 nm, 365 nm) 조사로 물질의 분리정도를 확인하였다(Fig. 3).

#### 4. HPLC 분석

분리한 물질의 순수분리정도를 확인하기 위해 HPLC 분석을 실시하였다. HPLC 검출기 파장을 설정하기 위하여 UV-visible spectrophotometer (Ultraspec 4000, pharmacia biotech, England)를 이용하여 200~900 nm full scanning을 실시하였다. HPLC 분석은 waters (Waters 600, pump 486) 기기를 이용하였으며, column은 SunFire C<sub>18</sub><sup>®</sup> (5 μm, 250 × 6 mm)를 사용하여 flow rate 0.5 mL/min으로 분석하였다. 검출기 파장은 270 nm, 이동상은 90% methanol (5% H<sub>2</sub>O, 5% acetonitrile) 혼합용매로 30분간 분석을 실시하였다.

#### 5. 살선충 활성 조사

*G. biloba* L. 외종피 추출물의 용매 분획물을 이용한 살선충 활성 조사는 Kim 등(2014)의 96-well microplate 방법을 응용하여 실시하였다. Well 당 증류수에 분리된 부식선충을 35~50마리씩 접종하여 24시간 동안 안정화시킨 후에 살선충 활성을 조사하였다. 물질 처리는 무처리, 음성대조구 및 은행 외종피 추출물과 분리단계별 분획물을 이용하였다. 음성대조구에는 물질용해에 사용한 DMSO를 처리하여 살선충 활성을 조사하였다. 이때, DMSO 최종 농도는 증류수의 1% 이하가 되도록 하였다. 선충 계대배양과 살선충 활성을 조사하기 위해 상대습도 100%와 온도 25°C로 조절된 배양기에서 선충을 배양하였다. 살선충 활성은 물질 처리 후 6시간 간격으로 24시간까지 현미경으로 선충 운동성을 관찰하였으며, 직선 형태로 움직임이 없는 것은 죽은 것으로 판단하였다. 원형으로 말려 있거나 바나나형태를 하고 있는 것들은 생사여부를 판단하기 위하여 니들로 자극하고, 움직임이 없으면 죽은 것

으로 판단하였다. 각 실험은 3회 반복 실시하였으며, 살선충률은 아래 식에 의해 산출하였다.

$$\text{살선충률(\%)} = \{(\text{처리구의 치사율} - \text{대조구의 치사율}) / (100 - \text{대조구의 치사율})\} \times 100$$

## 6. 통계분석

본 연구의 시험 결과들은 Window용 SPSS 통계프로그램(ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 Student t-test 및 ANOVA 법으로 검증하여 p값이 0.05 미만을 유의한 것으로 간주하였다.

## Ⅲ. 결과 및 고찰

### 1. 용매추출물의 살선충 활성

*G. biloba* L. 건조 외종피 500 g에 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (1:1) 혼합용매 2.5 L로 3회 반복 추출하여 추출물 147.5 g을 얻었으며, 추출물에 hexane, EtOAc, H<sub>2</sub>O를 순차적으로 가하여 용해도에 따른 각각의 용해 분획물을 얻었다. 각 분획물은 96-well microplate에 0.05, 0.1, 1 mg/mL 농도로 처리하여 부식선충에 대한 살선충 활성을 조사하였다. 식물추출물이나 합성화합물 등을 이용한 살선충 활성 검증에 *Rhabditis* sp.를 이용한 연구들을 볼 수 있으며(McGaw et al., 2007; Choudhary, G. P., 2013; Kim et al., 2014; Katarzyna et al., 2020). 살선충 활성 조사 결과 *Rhabditis* sp.와 식물기생선충에 대한 살선충 활성이 유의적으로 나타나 배양과 현미경 관찰이 용이한 부식선충을 사용하였다. Kim 등(2014)은 1,677종의 식물추출물을 이용한 살선충 활성조사에서 부식선충을 이용하여 1차 선발을 하고, 고구마뿌리혹선충으로 활성의 재현성을 확인한 결과, 유의적인 결과가 나타나 살선충 활성검증에 부식선충의 활용가치가 있는 것으로 평가했다.

은행 외종피 추출물을 처리할 때 물질 용해에 사용한 DMSO를 처리한 음성대조구와 hexane 용해물에서는 살선충 활성이 나타나지 않았으며, EtOAc 용해물과 H<sub>2</sub>O 용해물에서 살선충 활성이 나타났다. EtOAc 용해물에서는 0.1 mg/mL 처리농도에서 74% 살선충 활성이 나타났으며, 1 mg/mL 처리농도에서는 100% 살선충 활성이 나타났다(Table 1). H<sub>2</sub>O 용해 분획물을 0.1 mg/mL 처리구에서는 18%의 살선충 활성을 보였고, 1 mg/mL 농도 처리구에서는 28%의 살선충 활성으로 높게 나타나지는 않았다. 1차 추출물의 비극성 분획물에서는 활성이 나타나지 않았고, 극성이 높은 분획물에서는 활성이 낮았으며, EtOAc 분획물에서 가장 활성이 높게 나타나 물질 분리의 시료로 사용하였다.

Table 1. Nematicidal activity of the solvent fractionates of *G. biloba* L. outer seedcoat

Concentration (mg/mL)	DMSO	Hexane solute	EtOAc solute	H <sub>2</sub> O solute
0.05	-	-	50%***	13%**
0.1	-	-	74%**	18%***
1	-	-	100%**	28%*

\* % of nematicidal activity relative to control, -: Not nematode death. Calculated mean values are from three replicates  $\pm$  SD (n=3). \*\*\* p<0.001 vs DMSO (negative control, N.C), \*\* p<0.01 vs N.C, \* p<0.05 vs N.C

## 2. 살선충 물질 분리와 살선충 활성

은행 외종피 1차 추출물의 EtOAc 분획물로부터 살선충 활성물질을 분리하기 위하여 TLC법을 이용하였다. 1차 TLC는 hexane : EtOAc (1:4) 용매조건으로 전개시키고, 물질의 분리 패턴에 따라 6개의 band로 나누고(T1-1~6), 회수하여 살선충 활성을 조사하였다. 그 결과, 무처리와 음성대조구 DMSO를 처리한 곳에서는 2~5% 살선충 활성을 보였으며,  $R_f$  0.22~0.56 위치의 물질을 처리한 곳에서 살선충 활성이 가장 높게 나타났다. 물질 처리 후 24시간이 경과했을 때 0.01 mg/mL 농도로 처리한 곳에서는 49% 치사율을 보였고, 0.05 mg/mL 처리구에서 67% 치사율이 나타났다. 그 외에도 T1-3과 T1-6에서도 30% 이상의 치사율을 나타냈다. 1차 TLC에서 활성이 가장 높은 T1-4 물질을 다음 단계의 시료로 사용하였다. 2차 TLC에서도 물질의 분리 패턴에 따라 7개 구획으로 나누고(T2-1~7), 회수하여 살선충 활성을 조사한 결과, T2-5 ( $R_f$  0.14~0.47) 물질에서 가장 활성이 높게 나타나 T2-5를 3차 TLC에 사용하였다. 3차 TLC에서는 hexane : EtOAc (1:5) 용매조건으로 전개를 실시하였으며, 물질의 분리 패턴에 따라 6개의 구획으로 나누고(T3-1~6) 물질을 회수하였다. 살선충 활성을 확인한 결과, T3-3과 T3-5에서 살선충 활성을 보였으며, T3-3을 0.01 mg/mL와 0.05 mg/mL로 처리하였을 때 6시간 후에 각각 47%와 74%의 치사율을 보였다. 0.05 mg/mL 농도로 처리한 곳에서는 24시간 후에 거의 모든 개체가 치사되는 것을 확인했다. 나머지 처리구에서는 크게 활성을 확인할 수 없었다. 3차 TLC 후에 물질의 분리도가 높았으나, 순수분리하기 위하여 T3-5물질을 이용하여 4차 TLC를 실시하였다. 4차 TLC에서는 hexane : benzene : EtOAc (1:1:3) 용매조건으로 전개를 실시한 결과  $R_f$  0.33~0.53에 major로 band를 확인할 수 있었고, origin 부분 이외의 전개영역에서는 물질을 확인할 수 없었다(Fig. 2). 4차 TLC에서 분리한 살선충 물질(T4-3)을 물질의 분리정도와 살선충 활성을 조사하였다. 4차 TLC 후에  $R_f$  0.33~0.53 (T4-3) 물질을 중심으로 6개의 구획으로 나누고(T4-1~6, Fig. 2), 회수하여 살선충 활성을 조사하였다. T4-3과 T4-4를 제외하고는 활성이 나타나지 않았으며, origin 부분에서도 약간의 활성은 나타났지만 무의미한 정도였다. T4-3 물질을 처리한 곳의 살선충물을

보면, 0.01 mg/mL 농도로 처리한 곳에서는 18시간 경과 후에 56%의 선충 치사율을 확인할 수 있었고, 24시간 후에는 73%의 치사율이 나타났다. 0.05 mg/mL 농도를 처리한 곳에서는 18시간 후에 80%의 아주 높은 활성이 나타났으며, 24시간 후에는 88%의 살선충률이 나타났다(Fig. 4). T4-4물질에서도 활성이 나타난 것은 물질을 구획하고 회수할 때 short wave 흡광을 기준으로 회수하였기 때문에 Fig. 2. B를 보면 short wave에서 확인하기 어려웠던 물질의 끝림이 long wave에서 확인할 수 있었고, 그 이유로 T4-4에서도 활성이 나타난 것으로 판단된다.

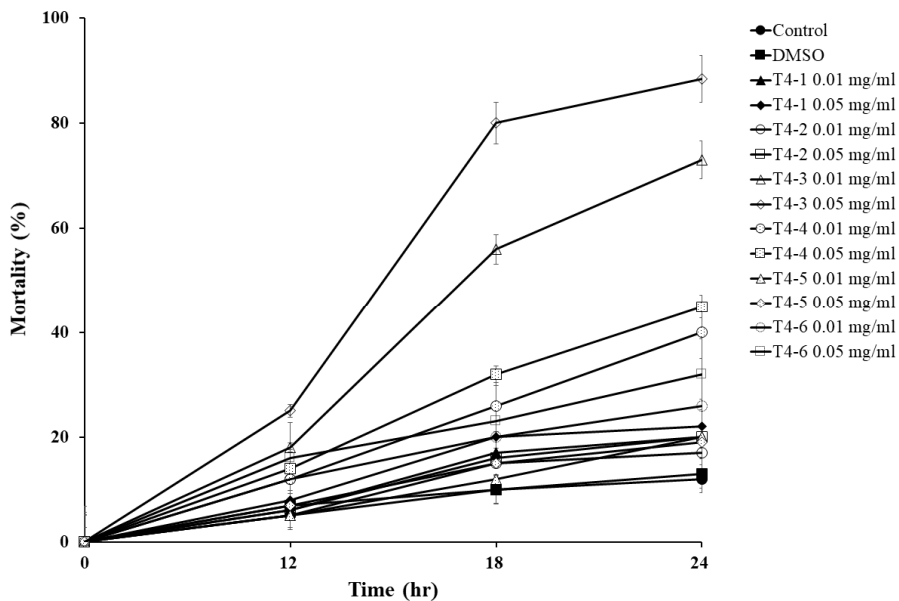


Fig. 4. Nematicidal activity of the 4<sup>th</sup> TLC isolates against the nematode *Rhabditis* sp.

### 3. 살선충 활성물질의 분리도

4차 TLC 후에 회수한 물질(T4-3)의 분리정도를 확인하기 위하여 prep-TLC와 HPLC를 실시하였다. 물질의 분리정도와 불순물 함유 등을 확인하기 위하여 prep-TLC를 실시한 후에 UV-365 nm (Fig. 3, C)와 UV-254 nm (Fig. 3, D) 조사로 물질을 확인하고, 마지막으로 황산 발색(Fig. 3, B)을 시켰을 때  $R_f$  0.5에 single spot을 확인할 수 있었다(Fig. 3). T4-3 물질의 순수분리를 prep-TLC만으로는 확정하기 어려워 HPLC 분석을 실시하였다. HPLC 분석을 위해서 UV-Vis spectrophotometer로 흡광도를 측정할 결과 270 nm와 330 nm에서 흡수대가 나타나(data not shown) HPLC 검출과장을 270 nm로 설정하였으며, HPLC 분석 용매조건은 MeOH : acetonitrile : H<sub>2</sub>O (90:5:5) 조건으로 30분 동안 실시하였다. 그 결과  $R_t$  8.609에서 single



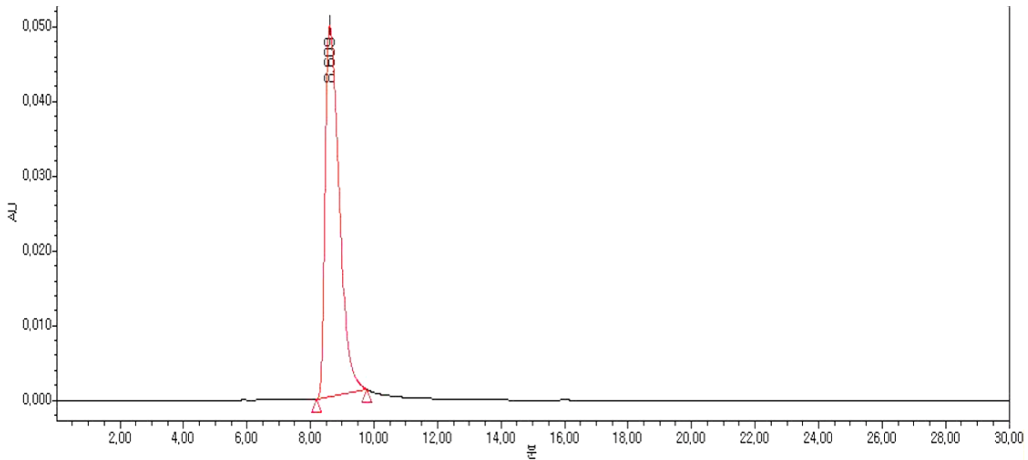


Fig. 5. HPLC spectrum of the nematocidal compound GB4-3.

peak로 확인되어 순수 분리된 것으로 판단하였다(Fig. 5). 순수 분리한 살선충 물질을 은행의 학명에 따라 GB4-3으로 명명하고 다음 단계의 실험을 실시하였다.

#### 4. 순수 분리한 물질의 살선충 활성화

순수 분리한 GB4-3 물질과 은행 외종피 조추출물을 이용하여 살선충 활성을 조사하였다. 은행 외종피는 MeOH로 추출하여 조추출물을 얻었고, GB4-3 물질은 EtOAc와 MeOH에 용해성을 갖는데 사용이 편리한 MeOH로 녹여 사용하였다. GB4-3 물질과 은행 외종피 추출물을 5, 10, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 처리하고, 6시간 간격으로 활성을 조사한 결과, 조추출물은 6시간 후에 10% 정도의 살선충 활성을 보였고, 순수 분리한 GB4-3을 처리한 곳에서는 약 20% 전후의 살선충 활성이 나타났다. 12시간 이후부터는 농도 비례적으로 활성이 증가하는 현상을 나타냈다(Fig. 6). 은행 외종피 조추출물을 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하고, 18시간 이후에 40%의 살선충 활성을 보여 살선충제 후보소재로 충분한 잠재력을 가지고 있는 것으로 판단된다. 순수 분리한 GB4-3은 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  처리구와 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  처리구에서 12시간 후에 약 40~48% 정도의 살선충 활성을 보였고, 18시간 후에는 각각 45%와 52%로 상승했으며, 조추출물에 비해서는 15% 이상 활성이 높게 나타났다. 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  처리구에서는 12시간 후에 약 53% 살선충 활성과 18시간 후에는 69%로 살선충 활성이 높게 나타났다(Fig. 6). 24시간 후에는 물질 처리와 살선충률을 조사하기 위한 광 노출과 환경변화 때문인지 농도에 비례적으로 활성이 증가하지는 않았다(Fig. 6). 식물체 조추출물을 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 처리한 곳에서 40%의 살선충 활성을 보인 은행 외종피는 선충방제제 개발에 좋은 후보원료라 판단된다. 은행 외종피 추출물은 살충 활성(Pan et al., 2006; So et al., 2012)과 항균 활성(Choi et

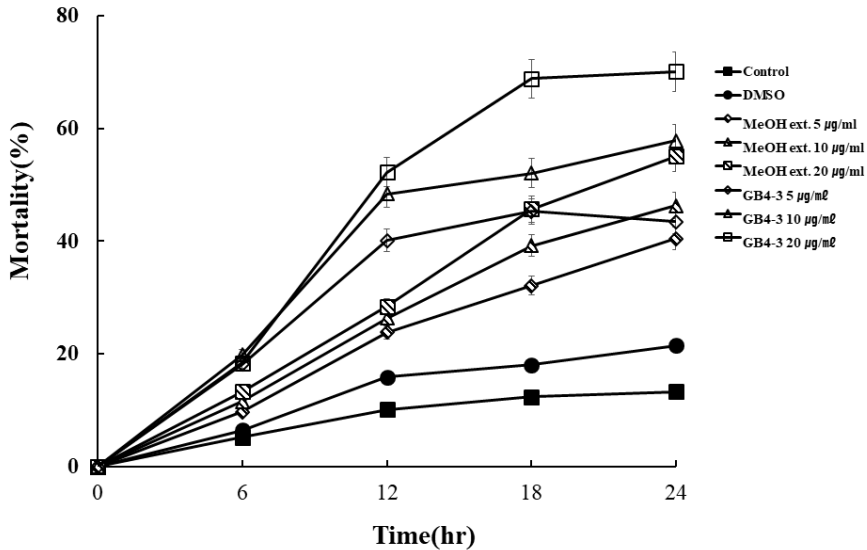


Fig. 6. Nematicidal activity of *G. biloba* L. outer seedcoat methanol extracts and GB4-3 against the nematode *Rhabditis* sp..

al., 2009; Park and Cho, 2011) 및 살선충 활성이 확인되어졌기 때문에 추출물을 잘 혼합하여 제제를 개발한다면 다목적 병해충 방제제가 될 수 있을 것이다. 순수 분리한 물질 GB4-3의 구조동정과 유도체 개발을 위한 선구물질로 활용하기 위해서는 양적으로 확보가 필요하며, 식물기생성 선충에 대한 살선충 활성 연구에 기초자료로 제공하고자 한다.

#### IV. 적 요

은행 종자와 잎은 많은 연구와 개발이 이루어졌으나, 외종피는 알리지 등의 부작용으로 사용을 기피해왔다. 본 연구에서는 버려지는 은행 외종피로부터 작물재배에 많은 피해를 주는 선충을 방제할 수 있는 천연물을 찾고자 했다. 은행 외종피 유기용매추출물의 H<sub>2</sub>O 분획물과 EtOAc 분획물에서 살선충 활성을 확인하였고, EtOAc 분획물에서 살선충 활성이 가장 높게 나타났으며, EtOAc 분획물을 0.1 mg/mL 농도 처리에서 74%의 살선충 활성이 나타났다. 4차례의 TLC를 실시하여 살선충 물질을 순수 분리하였으며, prep-TLC 에서 R<sub>f</sub> 0.5에 single spot을 확인하였고, HPLC 분석에서 R<sub>t</sub> 8.609에서 single peak를 확인하였다. 순수 분리한 물질을 GB4-3으로 명명하고, 살선충 활성을 조추출물과 농도별 비교하였다. 은행 외종피 조추출물 10 µg/mL 처리 후 18시간 후에 약 45%의 살선충 활성을 나타냈고, 20 µg/mL 처리한 곳에서는 55%의 활성을 보였다. 은행 외종피 추출물로부터 순수 분리한 물질 GB4-3을

20 µg/mL 처리한 곳에서는 18시간 후에 약 69%의 살선충 활성을 나타내 살선충제 개발 후보소재로서 가치가 있는 것으로 판단된다. 부식선충에 대한 살선충 활성화와 식물기생 선충에 대한 살선충 활성화의 유의성은 선행 보고에서 볼 수 있으나, 은행 외종피를 이용한 선충 방제제 개발을 위해서는 식물기생 선충류에 대한 살선충 활성을 조사할 필요가 있다. 농산물재배와 식물생육에 심각한 피해를 주는 선충 방제를 위한 친환경적 방제제의 개발은 절실히 필요하다. 이를 위해서는 식물이나 미생물 등의 생물소재를 이용하거나 천연소재의 부산물을 이용 또는 이들을 혼용한 혼합제제로 개발한다면 상승효과를 기대할 수 있을 것으로 판단한다.

[Submitted, December. 2, 2020; Revised, January. 6, 2021; Accepted, February. 10, 2021]

## References

1. Abo-Elyousr, K. A. M., H. M. M. Khalil Bagy, M. Hashem, S. A. M. Alamri, and Y. S. Mostafa. 2019. Biological Control of the Tomato Wilt Caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Using Formulated Plant Growth-promoting Bacteria. *Egypt. J. Biol. Pest Control* 29: 54-61.
2. Atkins, S. D., L. Hidalgo-Diaz, I. M. Clark, C. O. Morton, N. M. De Oca, P. A. Gray, and B. R. Kerry. 2003. Approaches for Monitoring the Release of *Pochonia chlamydosporia* var. *catemulata*, a Biocontrol Agent of Root-knot Nematodes. *Mycol. Res.* 107(2): 206-212.
3. Choi J. G., S. I. Jeong, C. S. Ku, M. Sathishkumar, J. J. Lee, S. P. Mun, and S. M. Kim. 2009. Antibacterial Activity of Hydroxyalkenyl Salicylic Acids from Sarcotesta of *Ginkgo biloba* Against Vancomycin-Resistant *Enterococcus*. *Fitoterapia* 80: 18-20.
4. Choudhary, G. P. 2013. Anthelmintic Activity of Leaves of *Coleus aromaticus* Benth. *IJAPBC*. 2(4): 609-610.
5. Han, S. B. and J. H. Kim. 2014. Research Trend of Biopesticides from *Ginkgo biloba* (L.) Leaves and External Seed Coat. *Korean J. Pestic. Sci.* 18(3): 210-219.
6. Katarzyna, D., K. Przemysław, P. Agata, B. K. Anna, and W. Monika. 2020. Synthesis and Anthelmintic Activity of New Thiosemicarbazide Derivatives — A Preliminary Study. *Molecules*. 25(12): 2770-2777.
7. Kim, D. G. and S. K. Choi. 2001. Effects of Incorporation Method of Nematicides on Reproduction of *Meloidogyne arenaria*. *Korean J. Appl. Entomol.* 40(1): 89-95.

8. Kim, D. G., Y. H. Ryu, C. S. Huh, J. A. Ryu, I. K. Yeon, and Y. S. Lee. 2014. Screening of Plant Extracts for Nematic Activity. *Res. Plant Dis.* 20(1): 37-49.
9. Lee, I. H., S. H. Choi, and J. Y. Park. 2006. A Study on the Antimicrobial Effect of *Ginkgo biloba* Leaves Extracts According to Concentrations of Ethanol for *Staphylococcus aureus*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 21(4): 312-316.
10. Lee, I. H., M. S. Seol, and J. D. Park. 2005. Repellent and Pesticidal Effect of *Ginkgo biloba* Leaves Extracts on the *Tetranychus urticae*, *Aphis gossypii* and *Myzus persicae*. *Korean J. Soc. Appl. Biol. Chem.* 48(2): 150-154.
11. Leistner E. and C. Drewke. *Ginkgo biloba* and Ginkgotoxin. 2010. *J. Nat. Prod.* 73(1): 86-92.
12. Lim, S. H., Y. Z. Zhu, M. S. Kim, Y. S. Lee, J. S. Son, D. S. Park, J. H. Hur, H. Y. Kim, H. J. Choi, K. H. Kim, and S. Kim. 2004. Nematicidal Activity of Korean Native Plants Against Root-knot Nematode, *Meloidogyne incognita*. *Korean J. Pestic. Sci.* 8(4): 353-357.
13. McGaw, L. J., D. Van der Merwe, and J. N. Eloff. 2007. In vitro Anthelmintic, Antibacterial and Cytotoxic Effects of Extracts from Plants Used in South African Ethnoveterinary Medicine. *Veterinary J.* 173(2): 366-372.
14. 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 Manag. Sci.* 62: 283-287.
15. Park, S. B. and G. S. Cho. 2011. Antimicrobial Activity of Extracts and Fractions of *Ginkgo biloba* Leaves, Seed and Outer Seedcoat. *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr.* 40(1): 7-13.
16. Siddiqui Z. A. and I. Mahmood. 1999. Role of Bacteria in the Management of Plant Parasitic Nematodes: A Review. *Bioresource Technol.* 69(2): 167-179.
17. So, S. S., T. H. Hwang, W. Akram, J. K. Choi, and J. J. Lee. 2012. Insecticidal Activities of *Ginkgo biloba* Seed Coat Extracts Against *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Entomol. Res.* 42: 158-162.
18. Søholm, B. 1998. Clinical Improvement of Memory and Other Cognitive Functions by *Ginkgo biloba*: Review of Relevant Literature. *Adv. Ther.* 15(1): 54-65.
19. Spiegel, Y., E. Cohn., S. Galper., E. Sharon, and I. Chet. 1991. Evaluation of a Newly Isolated Bacterium, *Pseudomonas chitinolytica* sp. nov., for Controlling the Root-knot Nematode *Meloidogyne javanica*. *Biocont. Sci. Technol.* 1(2): 115-125.
20. 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. *Korean J. Pestic. Sci.* 5(1): 24-29.
21. Yao, P., F. Song, K. Li, S. Zhou, S. Liu, X. Sun, A. K. Nussler, and L. Liu. 2007. *Ginkgo*

- biloba* Extract Prevents Ethanol Induced Dyslipidemia. Am. J. Chin. Med. 35(4): 643-52.
22. Zhu Y. Z., D. S. Park, M. R. Cho, J. H. Hur, and C. K. Lim. 2005. Suppression of *Meloidogyne arenaria* by Different Treatments of *Pasteuria penetrans*. Korean J. Pestic. Sci. 9(4): 437-441.