

韓 英 淑 教授指導  
碩士學位 請求論文

은행나무(*Ginkgo biloba* L.)잎 추출물의  
일부 식중독균에 대한 항균효과

2005

誠信女子大學校 大學院  
食品營養學科  
成 耆 沃

은행나무(*Ginkgo biloba* L.) 잎 추출물의  
일부 식중독균에 대한 항균효과

韓 英 淑 教授指導

이 論文을 碩士學位 論文으로 提出함

2004年 11月

誠信女子大學校 大學院

食品營養學科

成 者 沃

# 認 准 書

成耆沃의 碩士學位 論文을 認准함

審査委員 \_\_\_\_\_ 印

審査委員 \_\_\_\_\_ 印

審査委員 \_\_\_\_\_ 印

誠信女子大學校 大學院

# 감사의 글

먼저 대학원 생활을 잘 마무리하게 하시고 논문이라는 작은 결실을 맺게 해주신 하나님께 감사드립니다.

항상 따뜻한 관심과 격려로 이끌어주신 한영숙 교수님께 깊이 감사드립니다. 그리고 논문이 완성되기까지 항상 지도해주시고 조언해주신 안명수 교수님, 김혜영 교수님, 조은자 교수님, 안홍석 교수님, 이명숙 교수님께 감사의 마음을 드립니다.

또한 오지영 선생님, 주연언니, 민경언니, 해은언니, 아영, 선미언니, 은정을 비롯한 701호 식구들과 대학원 동기들에게도 감사드립니다.

대학원 생활 처음부터 끝까지 큰 힘과 위로가 되어 주었던 상진이와 항상 끈은 길로 이끌어 주신 김병수 목사님, 큰 위로가 되어준 여디디야 지체들, 그동안 많은 시간을 함께 할 수 없었지만 무엇보다 소중한 친구들 경순, 혜주, 진화, 재현, 응식, 혜선, 승하, 지은, 샘, 진원이, 현진언니에게도 고마움을 전합니다.

끝으로 한없는 사랑과 격려로 응원해주시는 존경하는 부모님과 사랑하는 기숙언니, 기청언니, 주현이에게 깊이 감사드립니다.

2005. 1월

기욱 올림

# 논문개요

본 연구는 천연 항균 소재를 탐색하기 위한 목적으로 국내에 자생하는 은행나무(*Ginkgo biloba* L.) 잎의 methanol 추출물을 용매별로 순차분획하여 4종의 식품 유해 미생물(*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*)에 대한 항균활성을 paper disc 법으로 살펴보았으며, 그 추출물과 재추출물의 최소저해 농도(Minimum inhibitory concentration, MIC), 생육곡선, 24시간에서의 생육저해율, 페놀성 화합물의 함량 측정, 열과 pH에 대한 안정성을 확인하였다. 나아가 현재 시판되는 주방 세제에의 첨가 효과를 살펴보았다. 한편 항균성 물질을 분리하기 위해 항균성이 높았던 butanol 재추출물을 선택하여 silica gel column chromatography, thin layer chromatography(TLC)를 실시하였으며, 이상의 실험들을 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 은행나무 잎의 methanol 추출물의 수율은 24.35 %이었다. 용매별 재추출물의 수율은 water 재추출물, chloroform 재추출물, butanol 재추출물이 각각 40.19%, 18.21%, 16.05%였다. 반면, n-hexane 재추출물과 ethylacetate 재추출물은 각각 8.6%, 4.64%로 10% 미만의 수율을 나타내었다.

2. Paper disc 법을 사용하여 조사한 용매별 항균효과는 methanol 추출물이 4종의 시험균주 모두에서 약 7.5mm로 비슷한 항균효과를 나타내었다. Ethylacetate 재추출물과 butanol 재추출물, water 재추출물은 *E.coli*에 대하여 9mm의 강한 항균효과를 나타내었고, *S. typhimurium*에 대하여는 8mm의 항균효과를 보였다.

3. Broth microdilution 법을 시행하여 균의 최소저해 농도(MIC)를 측정한 결과에서 butanol 재추출물의 항균활성이 *E. coli*와 *S. typhimurium*, *L. monocytogenes*에 대하여  $62.5\mu\text{g/ml}$ , *S. aureus*에 대하여는  $32.15\mu\text{g/ml}$ 로 상당히 낮은 MIC 값을 나타내었다.

4. 은행나무 잎 methanol 추출물과 용매별 재추출물을 농도별로 처리한 균들의 생육도를 균주별로 조사한 결과, 4종의 균주에 대하여 methanol 추출물과 ethylacetate 재추출물, butanol 재추출물이 첨가농도에 따라 항균효과가 상승하였다. 특히 ethylacetate 재추출물에서는 첨가된 농도 모두에서의 항균효과가 배양 48시간까지 지속되었다.

5. 24시간에서의 생육 저해율을 확인한 결과, methanol 추출물은 모든 균에 대하여 20%이상의 높은 생육 저해 효과를 나타내었고 특히 *S. aureus*에 대하여는 60%이상의 높은 저해율을 나타내었다. 재추출물 중에서는 butanol 재추출물에서 *E. coli*, *S. typhimurium*, *L. monocytogenes*에 대하여 50%이상의 생육저해를 나타내었다. Ethylacetate 재추출물에서는 4종의 균주 모두에 대해, water 재추출물은 *S. aureus*를 제외한 3종의 균주에 대해 20%이상의 생육저해를 나타내었다. n-Hexane 재추출물은 *E. coli*에 대해 74%의 생육저해를 보였고, *S. aureus*에 대해서는 100%이상의 강력한 생육저해를 보였다. Chloroform 재추출물에서도 *S. aureus*에 대해서 88%의 높은 저해율을 보였다.

6. 은행나무 잎 추출물과 재추출물에 대한 페놀성 화합물의 함량에 대하여 검토한 결과 butanol 재추출물의 페놀성 화합물의 함량이 methanol 추출물의 2배 이상이 되었다. Ethylacetate 재추출물에서도 이와 유사한 페놀성 화합물 값을 나타내었고, methanol 추출물, water 재추출물, n-hexane 재추

출물, chloroform 재추출물 순으로 페놀성 화합물 함량이 감소하였다.

7. 은행나무 잎의 methanol 추출물과 butanol 재추출물의 농도를 1 mg/disc로 하여 40, 80, 100, 120℃에서 각각 1시간 동안 열처리 한 후 *S. typhimurium*의 생육정도를 측정된 결과, 모든 처리구에서 대조구와 차이가 없는 항균활성을 보였는데, 특히 120℃의 처리에 의해서도 methanol 추출물에서 항균활성이 있는 것으로 나타나 열에 매우 안정한 물질임을 알 수 있었다.

8. 은행나무 잎의 pH 변화에 대한 항균력의 안정성을 조사하기 위하여 methanol 추출물과 butanol 재추출물의 농도를 1 mg/disc로 하여 pH를 2, 5, 7, 9, 11로 조절한 후 *S. aureus*의 생육정도를 조사한 결과 methanol 추출물은 모든 pH 조건에 대하여 대조구와 비교시 항균활성에 있어 차이가 나타나지 않아 pH 안정성이 매우 우수함을 알 수 있었고, butanol 재추출물은 산성에 대해서는 안정한 반면, 강알칼리쪽으로 갈수록 활성이 낮아지는 경향을 나타내었다.

9. 시판 주방용 세제에 methanol 추출물을 농도별로 첨가하여 4종의 균주에 대한 항균효과를 확인한 결과 특히 *E. coli*에 대하여 항균효과가 우수하였다. 즉, 500ppm의 추출물을 첨가한 군이 세제만 첨가한 군에 비해 약 16.15%, 1500ppm의 추출물을 첨가한 군은 0.08%( $1.0 \times 10^1$ CFU/ml)의 균수만이 잔존하였다. *S. aureus*에 대해서는 세제만을 첨가한 군에 비해 500ppm 첨가군에서 약 49%, 1000ppm 첨가군에서 약 34%, 1500ppm 첨가군에서 약 0.12%의 균수만이 잔존하였다. *S. typhimurium*에 대하여는 세제만을 첨가한 군에 비해 500ppm 첨가군이 약 83%, 1000ppm 첨가군이 약 58%, 1500ppm 첨가군이 약 20%의 잔존률을 보였다. *L. monocytogens*에 대해서는 1500ppm

의 추출물을 첨가한 균이 세제만을 첨가한 균에 비해 5.29%의 균수만이 잔존하여 뚜렷한 항균효과를 나타내었다.

10. 항균활성이 강한 재추출물로부터 유효성분을 검색할 목적으로 butanol 재추출물을 silica gel column chromatography를 행하여 118개의 분획을 얻어 항균력을 측정한 결과 대체로 49~60번의 분획이 4종의 균주에 대해 증가된 항균활성을 보였다.

11. silica gel column chromatography를 행하여 항균활성이 크게 나타난 분획물들의 TLC chromatogram을 얻었다. Rf 0.53에서 공통적인 물질균이 나타나고 있으나 항균활성이 강했던 분획 49~60번 부근에서 Rf 0.38의 물질균이 나타나 이 물질이 주 항균성 물질로 생각되었다.

이상의 결과로서 은행나무(*Ginkgo biloba* L.) 잎은 항균활성물질을 갖고 있고, 특히 butanol 재추출물이 4종의 균주에 대해 항균활성이 가장 컸으며, 또한 열과 pH에 안정하여 다양한 가공적성에 이용될 수 있고, 시판 세제의 항균성 상승 효과를 확인함으로써 항균 소재로서의 이용 가능성이 높음을 암시하였다. 한편 항균활성물질을 분리하기 위해 용매순차분획, silica gel, TLC를 실시하여 증가된 항균활성을 확인하였고, 차후 항균물질을 동정하고 안전성을 확인하여 은행나무 잎을 천연 항균 소재로 개발할 가치가 충분히 있다고 하겠다.

# 목 차

## 논문개요

I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	6
1. 실험재료 .....	6
1) 은행나무 (Gingko biloba L.) 잎 .....	6
2) 시약 및 기구 .....	6
3) 공시균주 및 배지 .....	6
2. 실험방법 .....	8
1) 항균 검색용 추출물 및 용매별 재추출물의 조제 .....	8
2) 은행나무 잎 추출물과 재추출물의 항균력 측정 .....	10
3) 최소저해농도 측정 .....	10
4) 농도별 미생물 생육저해곡선 측정 .....	10
5) 미생물의 생육 저해율 측정 .....	11
6) 페놀성 화합물의 함량 측정 .....	11
7) 열 및 pH 안정성 측정 .....	11
8) 시판세제에의 응용 .....	12
9) Silica gel column chromatography .....	13
10) Thin layer chromatography .....	13

<b>III. 결과 및 고찰</b> .....	14
1. 은행나무 잎 추출물과 용매별 재추출물의 수율 .....	16
2. 추출물과 용매별 재추출물의 항균력 .....	17
3. 추출물과 재추출물의 최소저해농도(MIC) .....	24
4. 추출물과 재추출물의 미생물에 대한 생육저해곡선 .....	27
1) <i>Escherichia coli</i> 에 대한 생육저해 .....	27
2) <i>Staphylococcus aureus</i> 에 대한 생육저해 .....	27
3) <i>Salmonella typhimurium</i> 에 대한 생육저해 .....	28
4) <i>Listeria monocytogenes</i> 에 대한 생육저해 .....	28
5. 추출물과 재추출물의 미생물에 대한 생육 저해율 .....	33
6. 추출물과 재추출물의 페놀성 화합물의 함량 .....	35
7. 추출물과 재추출물의 안정성 .....	38
8. 시판 세제에의 응용. ....	44
9. Silica gel column chromatography .....	53
10. Thin layer chromatography .....	58
<b>IV. 결론</b> .....	60
<b>Reference</b>	
<b>Abstract</b>	

# List of Tables

Table 1. List of microorganisms and media used for antibacterial activity tests. ....	7
Table 2. Yield ratios of extraction of <i>Ginkgo biloba</i> L. leaves by methanol. ....	15
Table 3. Yield ratios of extraction of <i>Ginkgo biloba</i> L. leaves by solvents. .	16
Table 4. Antibacterial activity of the methanol extract from <i>Ginkgo biloba</i> L. leaves on several microorganisms. ....	18
Table 5. Antibacterial activity of the solvent reextract from <i>Ginkgo biloba</i> L. leaves on several microorganisms. ....	19
Table 6. Minimum inhibitory concentration(MIC) of the extracts and the solvent reextracts of <i>Ginkgo biloba</i> L. leaves against several microorganisms. ....	26
Table 7. Contents of phenolic compound from the extracts of <i>Ginkgo biloba</i> L. leaves. ....	36
Table 8. Synergistic effect of antimicrobial activity of the detergent added methanol extract of <i>Ginkgo biloba</i> L. leaves preventing <i>E.coli</i> growth. ....	45
Table 9. Synergistic effect of antimicrobial activity of the detergent added methanol extract of <i>Ginkgo biloba</i> L. leaves preventing <i>S. aureus</i> growth. ....	46
Table 10. Synergistic effect of antimicrobial activity of the detergent	

	added methanol extract of <i>Ginkgo biloba</i> L. leaves preventing <i>S. typhimurium</i> growth. ....	47
Table 11.	Synergistic effect of antimicrobial activity of the detergent added methanol extract of <i>Ginkgo biloba</i> L. leaves preventing <i>L.monocytogenes</i> growth. ....	48

# List of Figures

- Fig. 1. Scheme of extraction and solvent fractionation of methanol extract from *Ginkgo biloba* L. leaves. .... 9
- Fig. 2. Antimicrobial activity of the methanol extract and the solvent reextracts of *Ginkgo biloba* L. leaves on *E. coli* ATCC 9637(A: MeEX, B: HeEX, C: ChEX, D: EtEX, E: BuEX, F: WaEX). ..... 20
- Fig. 3. Antimicrobial activity of the methanol extract and the solvent reextracts of *Ginkgo biloba* L. leaves on *S. aureus* ATCC 25923(A: MeEX, B: HeEX, C: ChEX, D: EtEX, E: BuEX, F: WaEX). ..... 21
- Fig. 4. Antimicrobial activity of the methanol extract and the solvent reextracts of *Ginkgo biloba* L. leaves on *Salmonella typhimurium* ATCC 14028(A: MeEX, B: HeEX, C: ChEX, D: EtEX, E: BuEX, F: WaEX). ..... 22
- Fig. 5. Antimicrobial activity of the methanol extract and the solvent reextracts of *Ginkgo biloba* L. leaves on *L. monocytogenes* ATCC 19115(A: MeEX, B: HeEX, C: ChEX, D: EtEX, E: BuEX, F: WaEX). ..... 23
- Fig. 6. Growth curves of *E. coli* in the media adding the extract and the solvent reextracts of *Ginkgo biloba* L. leaves. .... 29
- Fig. 7. Growth curves of *S. aureus* in the media adding the extract and the solvent reextracts of *Ginkgo biloba* L. leaves. .... 30
- Fig. 8. Growth curves of *S. typhimurium* in the media adding the extract

and the solvent reextracts of <i>Ginkgo biloba</i> L. leaves. ....	31
Fig. 9. Growth curves of <i>L. monocytogenes</i> in the media adding the extract and the solvent reextracts of <i>Ginkgo biloba</i> L. leaves. ....	32
Fig. 10. Inhibitory effect of the extracts of <i>Ginkgo biloba</i> L. leaves against several microorganisms for 24 hr at 37°C. ....	34
Fig. 11. Contents of phenolic compound from the extracts of <i>Ginkgo     biloba</i> L. leaves. ....	37
Fig. 12. Relative growth promoting activity of the methanol extract of <i>Ginkgo biloba</i> L. leaves for several microorganisms at heat treatment. ....	40
Fig. 13. Relative growth promoting activity of the butanol reextract of <i>Ginkgo biloba</i> L. leaves for several microorganisms at heat treatment. ....	41
Fig. 14. Relative growth promoting activity of the methanol extract of <i>Ginkgo biloba</i> L. leaves for several microorganisms at pH treatment. ....	42
Fig. 15. Relative growth promoting activity of the butanol reextract of <i>Ginkgo biloba</i> L. leaves for several microorganisms at pH treatment. ....	43
Fig. 16. Synergistic effect of antimicrobial activity of the detergent added methanol extract preventing <i>E. coli</i> growth. ....	49
Fig. 17. Synergistic effect of antimicrobial activity of the detergent added methanol extract preventing <i>S. aureus</i> growth. ....	50
Fig. 18. Synergistic effect of antimicrobial activity of the detergent added methanol extract preventing <i>S. typhimurium</i> growth. ....	51
Fig. 19. Synergistic effect of the detergent and methanol extract	

preventing <i>L. monocytogenes</i> growth. ....	52
Fig. 20. Antimicrobial acitivity against <i>E. coli</i> of the fractions of the butanol reextract fractionated by the silica gel column chromatography. ....	54
Fig. 21. Antimicrobial acitivity against <i>S. aureus</i> of the fractions of the butanol reextract fractionated by the silica gel column chromatography. ....	55
Fig. 22. Antimicrobial acitivity against <i>S. typhimurium</i> of the fractions of the butanol reextract fractionated by the silica gel column chromatography. ....	56
Fig. 23. Antimicrobial acitivity against <i>L. monocytogens</i> of the fractions of the butanol reextract fractionated by the silica gel column chromatography. ....	57
Fig. 24. Thin layer chromatogram of antimicrobial activity fraction(44~65 in number) of the butanol fraction separated by the silica gel column chromatography shown Fig. 20~23. ....	59

# I. 서론

오늘날 산업 문명이 고도로 발달함에 따라 우리의 식생활은 급격히 변화하고 있으며, 식품위생은 식품의 유해 미생물에 의해 야기되는 건강장해 즉 식중독과 관련하여 커다란 사회문제로서 그 중요성이 날로 증가되고 있다[1]. 식중독을 제어하기 위한 노력은 오래 전부터 계속되어 왔고, 식품 가공 산업에 HACCP (Hazard analysis and critical control point)와 같은 위생 관리 개념들이 도입되어 가고 있지만 세계적으로 식중독 발생보고는 계속 증가하고 있는 추세이다[2]. 그 원인[3]은 식품의 수출입이 자유화되고 수송속도가 빨라짐에 따라 식중독 세균의 전파속도가 빨라지고 있으며, Life style의 변화로 집단 급식, 냉장 및 냉동식품 등 즉석 식품의 소비 증가로 인해 동시에 많은 인원이 집단 식중독에 걸릴 가능성이 높아졌기 때문이다. 또한 일반인에 비해 면역 기능이 저하된 위험군의 수가 증가됨에 따라 식중독 세균에 감염시 발병할 가능성이 높아졌다.

식중독의 15~20%는 병원 물질이 불분명하지만 역학적인 면을 고려해 볼 때 대부분은 세균에 기인하는 것으로 생각되므로 식중독에 있어서 세균이 차지하는 비중은 대단히 크다[4]. 우리나라의 경우 보건복지부의 통계에 따르면 세균성 식중독에 의한 환자수는 1990년에 618명에서 1994년에 1746명과 1996년에 2676명으로 집계되었으며, 1998년도에는 4577명으로 계속적으로 증가하고 있다. 참고로 미국에서는 연간 650만 명에서 3300만 명의 식중독 환자가 발생하며 이 중 9000명이 사망하는 것으로 보고되고 있다[4].

식중독의 원인균으로는 오랫동안 우리에게 병을 일으키는 것으로 알려져 온 *Salmonella typhimurium*, *Vibrio paraheamolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* 등이 있으며, 최근 식생활의 변화와 검사방법의 발달로 증가되고 있는 새로운 식중독 미생물로서는

*Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica* 등이 있다[3].

이러한 유해 미생물의 정균 및 살균방법으로 살균제인 chlorinated water[4], acidified sodium chlorite[5], electrolyzed oxidizing water[6], hydrogen peroxide[7], chlorite dioxide[8], diacetyl[9]과 보존제인 sorbic acid[10], benzoic acid[11]등 합성 항균제 처리와 함께 감마선 처리[12]에 의한 식중독 미생물의 증식저해 방법이 보고되어 왔다. 그러나 화학적 합성에 의해 생산되고 있는 대부분의 항균제는 그 작용 범위가 좁을 뿐 아니라, 지속적으로 체내에 축적될 경우에 만성독성, 발암성, 돌연변이 유발성의 우려가 있어서[13] 최근 소비자들의 건강 지향적 욕구의 증대와 안전성에 대한 의식 고조로 합성 항균제에 대한 기피현상이 강하게 일고 있으며, 천연 항균제에 대한 선호 인식이 높아지고 있다[14, 15]. 대부분 천연 항균 물질은 동·식물 내에 한 성분으로 함유된 경우가 많으며, 단백질, 특정효소, 유기산, 식물정유, 식물의 특정 성분 등이 항균효과를 나타내는 것으로 알려져 있고[20], 특히 식물에 존재하는 항균물질은 그 대부분이 alkaloid류, flavonoid류, terpenoid류, phenolic compound류, quinone류 및 volatile oil 등의 이차대사 산물이거나 또는 그 유도체들로 알려져 있다[17-19]. 국내에서의 flavonoid의 항균성에 관한 연구를 살펴보면 한 등[92-96]은 rutin, quercitrin, quercetin, kaempferol 및 naringenin의 항세균 및 항진균작용에 대하여 보고하였다. 이외에도 naringin 및 naringenin의 항균력에 대한 연구가 보고되어 있다. 이 등[97, 98]은 속리산 싸리의 flavonoid 성분의 항균작용에 대하여 보고하였다. 지금까지 많은 연구가 수행된 대상은 양파, 생강, 마늘과 같은 향신료의 정유성분[20-24]과 함께 녹차, 커피 등의 다류[25-27]와 cashew apple[28]의 향기성분 등으로 우수한 항균효과가 있음이 보고되었고, 미생물, 특히 젖산균이 생산하는 bacteriocin[29-33]이나 갑각류인 게, 새우 등에 함유한 키틴질로부터 추출한 chitosans[34, 35]도 항균작용이 있다고 보고되었다. 생약재와 향신료를 다생으로 한 실험에서 *Streptococcus mutans*의 증식억제효과[36]가 인정되었고

고삼의 에테르 추출물[37], 소목의 75% 에탄올 추출물에서도 항균성 물질의 존재가 확인[38]된바 있다. Gram 양성균에 대하여 황백과, 뽕나무 추출물[39-41]은 증식억제효과가 뚜렷하였으며 간장의 방부효과를 위해서 황백추출물을 첨가[42]하는 등 천연물을 이용한 식품보존에 관한 실험들이 다방면으로 시도되고 있다.

천연물에 존재하는 항균성 물질을 항균소재로 이용하고자 하는 연구는 식품, 의약 및 생물공학산업 등에서 오래전부터 활발하게 진행되고 있다[43]. 그러나 대부분의 항균성에 대한 연구가 식품[44-48]이나 한약재[2, 44, 49-52]로 이용되는 식물체에 국한되고 있고 주위에서 흔히 구할 수 있는 많은 자생식물에 대해서는 연구가 미흡한 실정이다[52].

“살아있는 화석”이라 불리는 은행나무(*Ginkgo biloba* L.)는 약 2억년전부터 지구상에 존재했던 Ginkgoales로 알려진 식물군 중 지금까지 살아남은 유일한 식물이며[53], 암·수나무가 각각 다른 교목으로서 그 수명은 1000년을 넘는 장수목으로 알려져 있다. 중국이 원산이며 우리나라에는 고대 불교 전래와 함께 도입된 것으로 추정되며 수직적으로는 해발 500m이하에 잘 자라는 귀화 식물이다. 낙엽교목이며 높이 30~60m, 지름 4m 안팎으로 줄기는 회갈색이고 수피는 갈라지며 잎은 부채 모양이고 길이 5~15cm, 너비 8~15cm로서 차상맥을 가지며 짧은 가지에서는 총생한 것처럼 보인다. 5월에 꽃이 피고 꽃은 녹색이며 2가화로서 수꽃은 1~5개의 꼬리 모양의 화서에 달리고 화서축은 길이 3~4cm이며 암꽃은 1가지에 6~7개씩 달리고 길이 2cm정도의 화경에 각각 2개씩 배주가 달리지만 그 중 1개만이 결실된다. 열매는 8~10월에 성숙되고 열매의 황색종이는 악취가 나며 빨리 썩고 종자는 2~3개의 능선이 있으며 길이 1.5~2.5cm로서 흰색이기 때문에 백과라 불린다. 그 용도는 식용·관상용·공업용·약용으로 쓰이며 종자 속에 있는 배유는 황록색이고 식용하며 공원수 및 가로수 등으로 많이 심고 산사의 사원 뜰에도 흔히 심으며 나무는 귀중한 가구재 등으로 쓰이고 열매의 모양과 색깔이 황색으로서 겉모양이 살구와 비슷한 데서 은행이란 이름이 붙여졌다 한다[54].

은행잎은 예로부터 한방에서 고혈압, 당뇨병, 파킨슨 병, 위경련 등에 효과적인 것으로 알려져 왔으며 민간에서는 수렴약, 진해제 등으로 써 왔다[55]. 중국 전통 의약계에서는 수백년간 치료상의 목적으로 사용해왔고, 최근에는 서부 의약계에서 EGb761의 이름으로 은행잎의 건조추출물을 약으로 사용하고 있다. 이것은 정제된 acetone-water 추출액으로서 flavonol glycosides(24%)와 terpenoids(6%)로 구성되어 있다[56]. 은행잎의 주성분은 flavonoid계 화합물과 terpene계 화합물(bilobalide, ginkgolide A, B, C, D, M, J)임이 밝혀졌으며 이들 성분들의 다양한 생리활성과 약리작용이 속속 밝혀짐으로써 현재 이들 성분을 주성분으로 한 의약품이 전 세계적으로 크게 각광 받고 있는 실정이다. 은행잎의 flavonoid 성분은 화학적으로 flavonol glycoside류와 biflavone류로 분류할 수 있다. Biflavone계 화합물로서는 amentoflavone, 5-methoxybilobetin, ginkgetin, isoginkgetin, sciadopitysin 및 bilobetin 등 6종의 화합물이 분리, 보고 되었으며, flavonol glycoside계 화합물들은 22종이 밝혀졌으며 이를 크게 3종류의 subgroup으로 분류되고 있다. 즉 aglycone의 종류에 따라 kaempferol, quercetin 및 isorhamnetin의 glycoside로 대별되고 있다. 성분인 flavonoid 성분 중 특히 kaempferol 및 quercetin의 coumaroyl glycorhamniside가 가장 중요한 유효 생리활성 물질로 알려져 있다[57].

이와 같이 은행잎 성분의 화학적 고찰과 약리 작용에 대해서는 많은 연구와 보고가 되어 있으며[58, 59], 은행잎의 항균성에 관해서 몇몇의 연구자들이 미생물의 생육을 저해하는 성분을 분리하려고 시도하고 있다[56]. 은행잎으로부터 분리된 성분 중에서 Adawadkar 등[60]은 *Mycobacterium smegmatis*에 대해 anacardic acids의 활성을 보고했고, Itokawa 등[61]은 *Staphylococcus aureus*와 *Enterococcus faecalis*에 대해 약한 항균활성을 보고했다. 은행잎의 acetone 추출물은 *Erwinia amylovora*, *E. coli*, *Pseudomonas phaseolitica*, *Xantomonas phaseoli*, *Bacillus pumilus*에 대해 활성을 보였다. 이의 은행잎 성분인 Aldehyde 2-hexenal은 매우 낮은 농도에서 항진균성을 보였다. 은행잎

을 대기 중의 활성산소 하에서 증류하여 얻어진 정유는 100ppm에서도 *Monilinia fructicola*에 대해 활성을 보였다[62]. Mourey 등[63]은 acetone/water 추출액(50/50, v/v)의 항균활성을 조사한 결과, 많은 세균의 활성이 저해되었고, 곰팡이에 대해서는 몇 종만 저해성이 있는 반면, 효모에 대하여는 모두 저항성이 있었으며, *Pneumocystis carinii*에 대해 bilobalide가 활성이 있었다[64, 65]. Mazzanti 등은 ethyl acetate 분획물에서 gram 양성균과 효모에 대해 항균성을 발견했는데, 이 분획물의 HPLC 분석 결과 *E. faecalis* 31에 대한 항균성이 있는 두 개의 peak를 발견할 수 있었고, 이 peak는 rutin, bilobalide, ginkgolide A, B와 같이 일반적으로 은행잎의 성분으로 알려진 것과는 다르다고 하였다[56]. Huang 등은 은행잎으로부터 GAFP라고 부르는 항진균성 peptide를 분리했고[66], 정 등[67]이 은행잎 추출물의 *Bacillus cereus*에 대한 항균효과를 보았다. 그러나 은행나무 잎의 식중독 균에 대한 항균효과에 대해 체계적으로 연구된 바가 적다. 따라서 본 연구에서는 여러 가지 약리적 효과와 함께 국내에 자생하는 자원식물로서 보존·활용 가치가 높은 은행나무 잎을 이용하여 극성에 따라 용매별로 추출하고, 4종의 식품유해 미생물(*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*)에 대한 항균효과를 paper disc 법, 최소저해농도(MIC), 생육 저해율과 생육저해곡선을 조사함으로써 측정하였다. 또한 페놀성 화합물을 정량하여 항균력과의 연관성을 알아보고, 열과 pH에 대한 안정성을 검증하며, 나아가 현재 시판되고 있는 주방용 세제에 적용하여 그 효과를 조사하여 은행나무 잎의 천연 항균 소재로서의 가능성을 제시하고 이용가치를 높이고자 하였다. 한편 천연 항균성 물질을 분리하기 위하여 에탄올 추출물로부터 용매로 순차분획한 butanol 재추출물을 silica gel column chromatography, thin layer chromatography(TLC)를 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

#### 1) 은행나무(*Ginkgo biloba* L.) 잎

본 실험에서 사용한 은행나무 잎은 11월에 서울 근교 지역에서 수집하여 대한식물도감과 문헌 등을 참고로 하여 동정하였다. 동정된 은행나무 잎은 증류수로 2~3회 수세한 뒤 물기를 제거한 후 음건하였고, 분쇄기(HMF-340, Hanil, Korea)로 분쇄하여 추출용 시료로 사용하였다.

#### 2) 시약 및 기구

추출에 사용한 Methanol, n-Hexane, Chloroform, Ethylacetate, Butanol은 Duksan(Korea)사의 시약을 사용하였다. Paper disc는 Whatmen(England)사의 제품을 사용하였고, membrane filter는 Advantec(U.S.A)의 제품을 사용하였다.

#### 3) 공시균주 및 배지

배지 제조에 사용된 Tryptic Soybean Agar(TSA), Tryptic Soybean Broth(TSB), Plate Colony Agar(PCA)는 Difco(U.S.A.)사의 제품을 사용하였고, 사용된 균주는 한국생명공학연구원 유전자은행으로부터 분양 받아 계대하여 37℃에서 24~48시간 배양하여 활성화시켜 사용하였다(Table 1).

**Table 1. List of microorganisms and media used for antibacterial activity tests.**

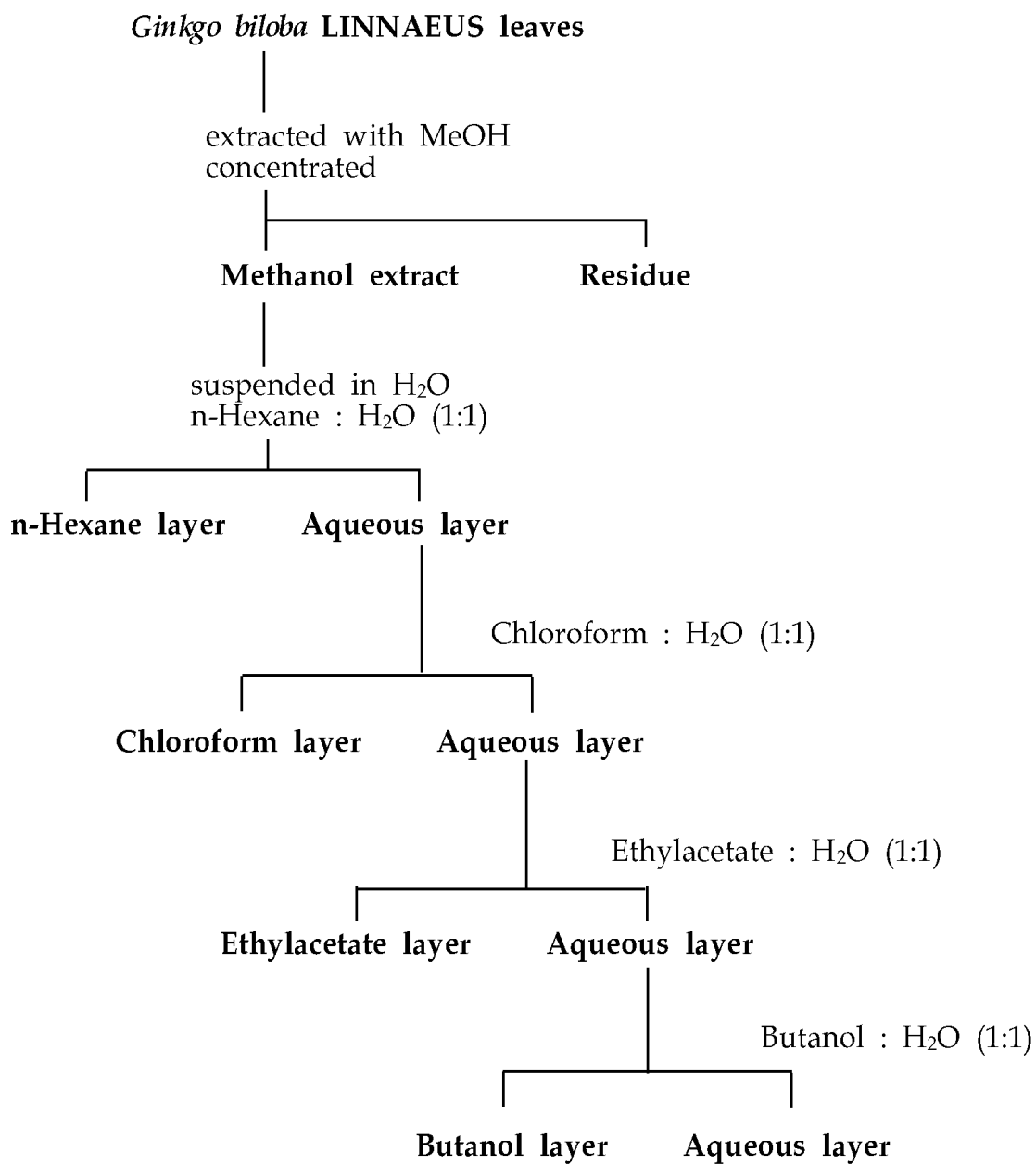
Microorganism tested		Media used	Temp. (°C)
Gram negative	<i>Escherichia coli</i> ATCC 9637	TSA&TSB	37
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	TSA&TSB	37
Gram positive	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	TSA&TSB	37
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	TSA&TSB	37

## 2. 실험 방법

### 1) 향균 검색용 추출 및 재추출물의 조제

은행나무 잎 추출물의 조제는 조제된 분말 시료와 methanol을 1:10(w/v)의 비율로 혼합하여 실온에서 6시간동안 3회 반복하여 교반 추출하였다. 이 추출액을 여과지(Whatman NO.2)로 여과한 후 회전 진공증발기(Rotary evaporator N-1000, EYELA, JAPAN)로 45℃의 수욕상에서 감압 농축하였다.

Methanol 추출물은 극성에 따라 n-hexane, chloroform, ethylacetate, butanol로 Fig.1 에 나타난 바와 같이 순차적으로 용매 분획하였다. 즉, methanol 추출물에 10배의 증류수와 n-hexane을 첨가하여 분획한 후 감압 농축하여 n-hexane 재추출물을 얻었다. 동일한 방법으로 chloroform, ethylacetate, butanol, water 층을 분획하여 각각의 재추출물을 얻었다. 각 재추출물은 해당 용매로 용해시켜  $\phi$  0.45 $\mu$ m membrane filter로 제균한 후 4℃의 냉장고에서 보관하면서 실험에 사용하였다. 고형분의 함량은 농축된 추출물과 재추출물 1ml을 취하여 105℃에서 건조 후 증발 잔사량을 계산하였다.



**Fig. 1.** Scheme of extraction and solvent fractionation of methanol extract from *Ginkgo biloba* L. leaves.

## 2) 은행나무 잎 추출물과 재추출물의 항균력 측정

은행나무 잎의 추출 용매별 항균력을 알아보기 위하여 한천배지 확산법 [68]을 사용하였다. 우선 Agar 1.5%가 함유되어 있는 배지를 petri dish에 분주하여 하층배지를 만들고, 그 위에 각 세균을 접종한 0.6%의 agar 배지를 부어 2중의 평판배지를 만들었다. 이렇게 제조된 평판배지에 소정 농도의 화합물을 마운트한 paper disc(직경 6mm)를 올려놓고 37°C에서 24~48시간 배양한 후 disc 주변에 형성되는 생육저지환(clear zone)의 직경을 측정하여 항균력을 검토하였다. 직경은 digimatic caliper(Mitutoyo Co.)을 이용하여 소수점 둘째 자리까지 측정하였다.

## 3) 최소저해농도(Minimum inhibitory concentration) 측정

각 균주의 최소저해농도(MIC)는 broth microdilution method[69]에 의해 다음과 같이 결정하였다. 즉, 96 well plate(FALCON, USA)에 TSB를 100 $\mu$ l씩 분주하고 100 $\mu$ l의 추출물을 two-fold dilution하여 농도를 조절한 후 균의 농도를  $2 \times 10^4 \sim 10^5$  CFU/ml이 되도록 희석시켜 100 $\mu$ l씩 첨가하였다. 그 후 37°C에서 24시간 배양한 뒤, 650nm에서 microplate reader(Biolog Inc. U.S.A.)로 흡광도를 측정하였다. Turbidity가 나타나지 않은 해당 시료 농도를 MIC값으로 결정하였다.

## 4) 농도별 미생물 생육저해곡선 측정

은행나무 잎 추출물과 재추출물의 생육저해 농도 측정은 농도별 항균력 측정과 마찬가지로 Turbidimetric Assay로 하였다. 즉, 균이 활성화된 10ml의 TSB 배지에 추출물과 재추출물을 농도별로 첨가하고 37°C에서 배양하면서 0, 4, 8, 12, 24, 36, 48시간이 되는 때에 650nm에서 microplate

reader(Biolog Inc. U.S.A.)로 흡광도를 측정하였다.

## 5) 미생물의 생육 저해율 측정

은행나무 잎의 미생물의 생육 저해 측정은 TSB 배지 10ml에 추출물 및 재추출물을 1000ppm 농도로 주입하고, 각 균주의 활성액을 0.1ml 접종하여 37℃에서 24시간 배양하였다. 배양 후 microplate reader(Biolog Inc. U.S.A.)를 이용하여 650nm에서 흡광도를 측정하고 이용하여 다음 식으로 생육저해율(%)을 확인하였다[46, 70].

% Inhibitory effect

$$= \frac{(\text{control-control blank}) - (\text{treatment-treatment blank})}{(\text{control-control blank})} \times 100$$

## 6) 페놀성 화합물의 함량 측정

은행나무 잎의 추출물 및 재추출물의 페놀성 화합물의 함량을 분석하기 위해 각 1mg의 시료를 증류수 2ml로 희석하고 페놀시약(Folin-Ciocalten's reagent) 1ml를 넣어 강하게 흔든 뒤 즉시 20% 탄산나트륨 5ml을 첨가하고 증류수로 10ml이 되게 하였다. 이것을 잘 섞어 실온에서 20분간 방치한 후, 분광광도계(UV/Visible spectro photometer, Pharmacia Biotech, U.S.A)로 730nm에서 흡광도를 측정하였다[71, 72].

## 7) 열 및 pH 안정성 측정

은행나무 잎 추출물의 열 안정성을 측정하기 위해 40, 80, 100, 120℃에서 1시간 동안 열처리한 후 처리 온도별로 은행나무 잎 추출물과 butanol 재추출물의 농도가 1 mg/disc가 되도록 paper disc method로서 항균력 측정방법과 동일하게 측정하였다. pH 안정성은 은행나무 잎 추출물과 butanol 재추출물을 HCl과 NaOH로 pH를 2, 5, 7, 9, 11로 조정한 후 시료를 가하고 37℃에서 1시간 동안 방치한 다음 pH 7로 중화시켜 열 안정성과 동일한 방법으로 측정, 비교하였다.

## 8) 시판 세제에의 응용

은행나무 잎 추출물을 시판 세제에 농도별(0, 500, 1000, 1500 ppm)로 첨가하여 실제 주방 용구(나무 도마)에 적용함으로써 세제에의 항균 보강 효과를 조사하였다. 즉, 멸균된 나무 도마의 같은 면적 내(1 cm×1 cm)에 18시간 배양한 균(*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*)의 활성액( $2.58 \times 10^9$  cfu/ml)을 100  $\mu$ l 분주하여 골고루 도말한 뒤 1시간 실온에서 방치하고, 농도별로 추출물이 첨가된 같은 양의 세제 시료를 분주하여 1시간 다시 실온에서 방치한 후 5 초 동안 흐르는 수도물에 1회 수세하였다. 세제 시료는 시판 세제(세이프, LG 생활건강)를 원액으로 세제에 명시된 표준 사용량(2 g/L)으로 희석하여 사용하였다. 그 후 도마 표면에 남아있는 균을 swab법[73]을 수정하여 채취하였다. 즉, 100  $\mu$ l의 0.85 %의 멸균 생리식염수를 분주하고 습한 멸균 면봉으로 닦아내었다. 이를 10 ml의 멸균 생리식염수가 들어있는 시험관에 넣어 세계 진탕하고, 10배 계단 희석하여 PCA(plate count agar) 배지에 도말하고 배양하여 성장한 colony를 계수하여 살아 남아있는 균의 수를 확인하였다.

## 9) Silica gel column chromatography

메탄올 추출물을 용매분획하여 얻은 각 재추출물들의 항균활성을 측정 비교한 후, 활성이 가장 강한 butanol 재추출물로부터 유효성분을 검색할 목적으로 silica gel column chromatography를 행하여 각 subfraction에 대한 항균활성을 비교하였다. 즉 유리 column( $\phi 4.6 \times 40$ cm)에 시료의 약 10배의 활성화된 silica gel(70~230mesh, Sigma)을 ethylacetate로 slurry로 만들어 충전한 후, 시료(20g)를 ethylacetate-MeOH 용매계로 MeOH농도를 단계적으로 증가시키면서 용출하였다. 유속은 2.0ml/min으로 하였고 fraction collector를 사용하여 분획당 10ml씩 분취하였다. 이와 같이 얻은 각 분획물들을 감압농축하고 paper disc 방법에 따라 항균성을 측정하여 활성이 나타나는 분획을 확인하여 항균활성 분획물을 얻었다.

## 10) Thin Layer Chromatography

Silica gel column chromatography를 행하여 항균활성이 크게 나타난 분획물들을 thin layer chromatography(TLC)로 분리하여 항균성 물질을 검색하였다. 즉 항균성이 확인된 분획물을 capillary tube로 TLC plate에 점적한 후, 전개용매에 의해 포화 상태가 형성된 전개조에서 전개시켰다. 전개용매는 Ethylacetate-MeOH 용매(7:3)를 사용하였고, TLC plate는 254nm, 375nm의 UV 하에서 관찰하였다.

### Ⅲ. 결과 및 고찰

#### 1. 은행나무 잎 추출물과 용매별 재추출물의 수율

은행나무 잎 시료를 methanol로 실온에서 6시간 동안 3회 반복하여 교반 추출한 methanol 추출물과, 그 methanol 추출물을 극성에 따른 용매별로 얻은 용매별 재추출물의 수율은 Table 2, 3과 같았다. 재추출물 중에서 Water 추출물이 40.19%로서 가장 높은 수율을 나타내었고, ethylacetate 재추출물이 4.64%로 가장 낮은 수율을 나타내었다. 이상의 결과로 볼 때, 은행나무 잎의 methanol 추출물에는 친수성 물질에 비해 친유성 물질이 적은 것으로 사료되었다.

**Table 2. Yield ratios of extraction of *Ginkgo biloba* L. leaves by methanol.**

extract	Yields (% , w/w)
MeEX	24.35

MeEX: methanol extract

$$\text{Extraction yield (\%)} = \frac{\text{solid in extract gr}}{\text{raw material gr(dry weight)}} \times 100$$

**Table 3. Yield ratios of extraction of *Ginkgo biloba* L. leaves by solvents**

Reextracts	Yields (% , w/w)
HeEX	8.6
ChEX	18.21
EtEX	4.64
BuEX	16.05
WaEX	40.19

HeEX: n-hexan reextract from MeEX

ChEX: chloroform reextract from MeEX

EtEX: ethylacetate reextract from MeEX

BuEX: butanol reextract from MeEX

WaEX: water reextract from MeEX

$$\text{Reextraction yield (\%)} = \frac{\text{solid in solvent fraction gr}}{\text{solid in MeOH extract gr(dry weight)}} \times 100$$

## 2. 추출물과 용매별 재추출물의 항균력

은행나무 잎 추출물과 용매별 재추출물의 항균효과를 paper disc method로 조사한 결과는 Table 4, 5와 Fig. 2~5에 나타난 바와 같았다. Methanol 추출물은 4종의 균주(*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*)에 대하여 생육저해환의 직경이 약 7.5mm로 비슷한 항균효과를 나타내었다. 용매별 재추출물에서는 특히 *E. coli*와 *S. typhimurium*에 대하여 강한 항균활성이 나타났는데, 그 중 ethylacetate 재추출물과 butanol 재추출물, water 재추출물이 *E. coli*에 대하여 약 9mm의 항균효과를 나타내었고, *S. typhimurium*에 대하여는 약 8mm의 항균효과를 보였다. 강[74]은 ethylacetate 재추출물과 butanol 재추출물에서 현저한 생육억제 효과가 나타났으며 chloroform 분획물과 water 분획물에서도 앞의 두 가지 분획물보다는 낮지만 대부분의 균주에 대하여 항균활성을 보였다고 보고한 것과 본 실험의 은행나무 잎 추출물과 재추출물의 항균활성이 유사한 것으로 나타났다. 이상의 결과로 볼 때 은행나무 잎 추출물 중의 항균성 물질은 특정용매에만 용해되지 않고 일부 다른 용매에도 용해되는 성분으로서 여러 가지 성분이 서로 복합적으로 작용을 하고 있는 것임을 알 수 있으며, ethylacetate 재추출물과 butanol 재추출물, water 재추출물의 높은 항균활성으로 은행나무 methanol 추출물의 항균활성 물질이 이들 재추출물로 많이 이행되었음을 알 수 있었다.

**Table 4. Antibacterial activity of the methanol extract from *Ginkgo biloba* L. leaves on several microorganisms.**

Clear zone diameter(mm) <sup>a</sup>			
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
7.57	7.43	7.46	7.30

<sup>a</sup> Values are the diameter of inhibitory zone of including the disc(6mm).

**Table 5. Antibacterial activity of the solvent reextract from *Ginkgo biloba* L. leaves on several microorganisms.**

Reextractions (1mg/disc)	Clear zone diameter(mm) <sup>a</sup>			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
HeEX	7.64	7.70	7.53	7.30
ChEX	7.64	7.70	7.53	7.30
EtEX	8.78	7.50	7.84	7.37
BuEX	8.78	7.18	7.84	7.37
WaEX	8.78	7.20	7.84	7.37

<sup>a</sup> Values are the diameter of inhibitory zone of including the disc(6mm).

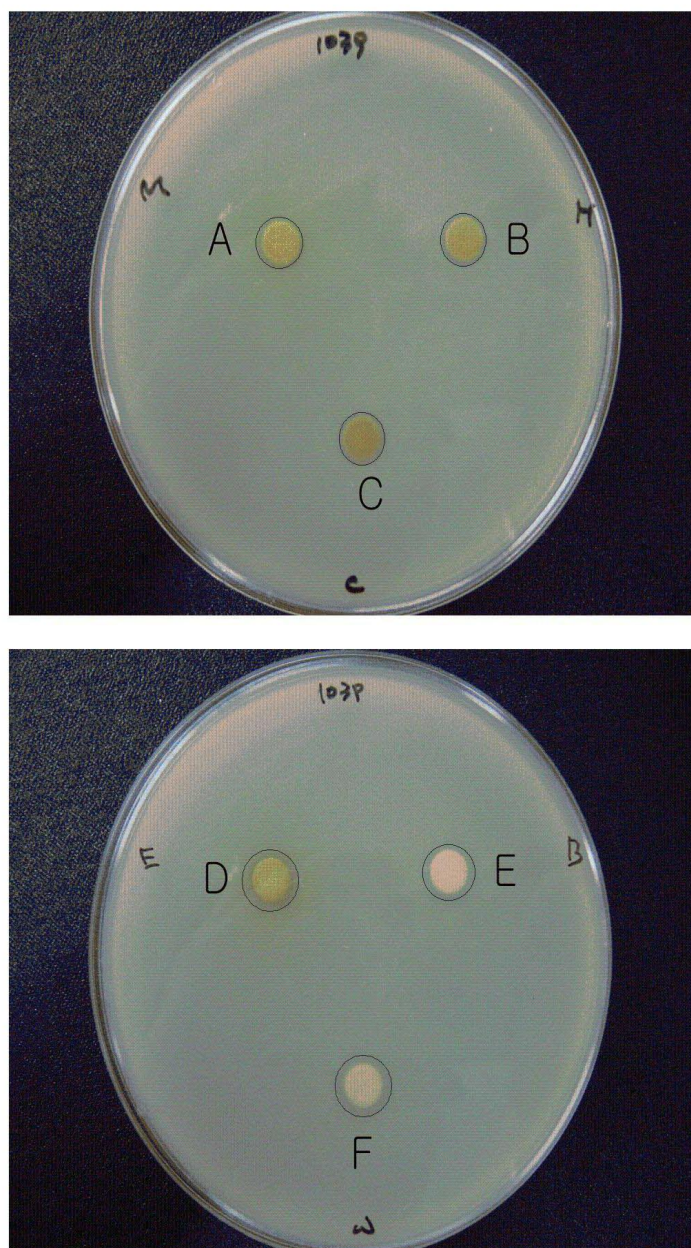


Fig. 2. Antimicrobial activity of the methanol extract and the solvent reextracts of *Ginkgo biloba* L. leaves on *E. coli* ATCC 9637(A: MeEX, B: HeEX, C: ChEX, D: EtEX, E: BuEX, F: WaEX).

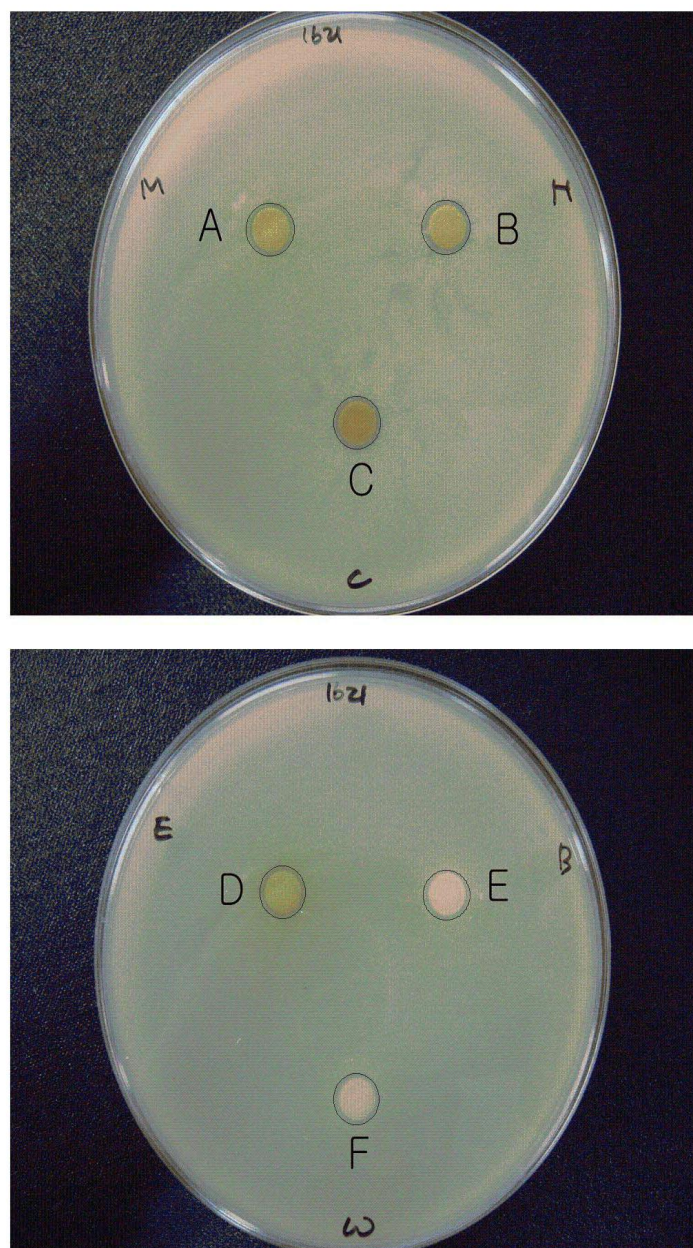


Fig. 3. Antimicrobial activity of the methanol extract and the solvent reextracts of *Ginkgo biloba* L. leaves on *S. aureus* ATCC 9637(A: MeEX, B: HeEX, C: ChEX, D: EtEX, E: BuEX, F: WaEX).

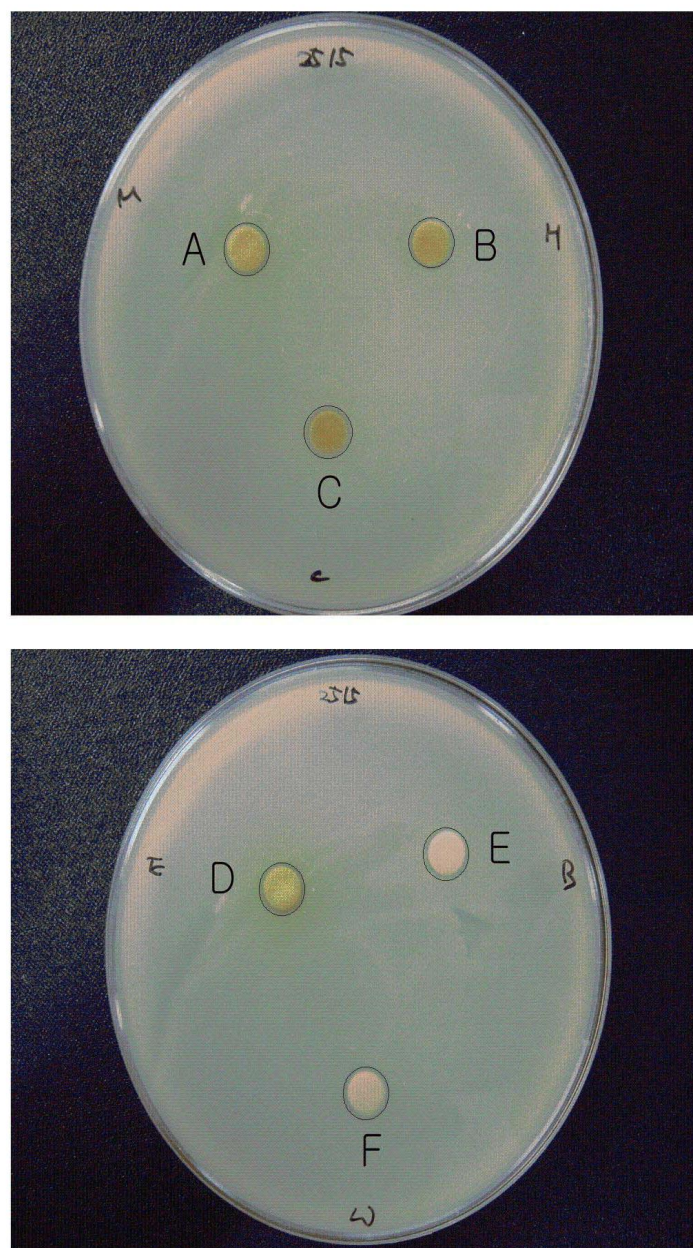


Fig. 4. Antimicrobial activity of the methanol extract and the solvent reextracts of *Ginkgo biloba* L. leaves on *S. typhimurium* ATCC 9637(A: MeEX, B: HeEX, C: ChEX, D: EtEX, E: BuEX, F: WaEX).



Fig. 5. Antimicrobial activity of the methanol extract and the solvent reextracts of *Ginkgo biloba* L. leaves on *L. monocytogenes* ATCC 9637(A: MeEX, B: HeEX, C: ChEX, D: EtEX, E: BuEX, F: WaEX).

### 3. 추출물과 재추출물의 최소저해농도 (Minimum inhibitory concentration, MIC)

각 추출물에 대하여 broth microdilution 법을 시행하여 균의 최소저해 농도를 측정한 결과는 Table 6과 같았다. 특히 butanol 재추출물의 항균활성이 가장 좋았는데 *E.coli*와 *S. typhimurium*, *Listeria monocytogens*에 대하여 62.5  $\mu\text{g/ml}$ , *S. aureus*에 대하여는 32.15 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 상당히 낮은 MIC 값을 나타내어 시료의 적은 양으로도 항균 활성을 나타내고 있음을 알 수 있었다. Ethylacetate 재추출물과 water 재추출물은 4종의 균주에 대하여 1000 $\mu\text{g/ml}$  이하의 농도에서는 항균성을 나타내지 않았다. 홍 등[75]은 유백피의 butanol 재추출물에서 *B. subtilis* 에 대한 강한 항균성이 있다고 보고하였으며, 정 등[76]은 밤나무 잎의 용매분획별 추출물에서 gram(+)균과 gram(-)균 모두 ethyl acetate 및 butanol 재추출물에서 활성을 나타내었다고 보고한 것과 유사한 경향을 나타내었다.

항균제 감수성 검사법으로 MIC 값을 측정하는 것이 가장 정확한 방법으로 알려져 있는데[77], 시험관 희석법, 한천 희석법, 미량 희석법 (microdilution) 등이 여기에 속한다. 특히 미량 희석법은 소량의 배지와 항균제를 사용하기 때문에 결과의 정확성에 문제점이 있을 수 있지만, 종래의 감수성 검사법보다 간편하고 경제적이며 신빙성이 있다는 보고[78-80]가 많이 나오고 있으며 실제 그 사용 빈도가 점점 증가하는 추세이다[81, 82]. 본 연구에서는 4종의 세균이 모두 빠른 시간의 생육도를 가지고 있다는 사실과 optical density의 측정과 균의 발육 기준을 설정하여 MIC 값을 판정함으로써 미량희석법에 의한 오차를 줄이도록 하였다.

한편, paper disc 법(Table 4)에서 나타났던 항균력과 액체 배양에서 보여진 항균력의 차이는 Tabak 등[83]과 이 등[84]의 결과와 유사한 결과로서 고

체 배양법과 액체 배양법에서의 추출물의 확산정도 차이에 의한 것으로 생각된다.

**Table 6. Minimum inhibitory concentration(MIC) of the extracts and the solvent reextracts of *Ginkgo biloba* L. leaves against several microorganisms.**

extracts	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	<i>Escherichia</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i>
	<i>coli</i>	<i>aureus</i>	<i>typhimurium</i>	<i>monocytogenes</i>
MeEX	1000	1000	-	-
HeEX	500	1000	1000	500
ChEX	-	1000	1000	1000
EtEX	-	-	-	-
BuEX	62.5	31.25	62.5	62.5
WaEX	-	-	-	-

<sup>1)</sup>- : not detected

## 4. 추출물과 재추출물의 미생물에 대한 생육저해 곡선

### 1) *Escherichia. coli*에 대한 생육저해

실험에 사용된 추출물들이 *E. coli*의 생육특성에 미치는 영향은 Fig. 6에 나타낸 바와 같았다. Methanol 추출물에 대하여는 4000ppm을 첨가하였을 때 항균효과가 나타났으며 n-hexane 재추출물과 water 재추출물은 모든 농도에서 항균활성이 보이지 않았고, butanol 재추출물에서는 첨가농도에 따라 항균활성이 약간 증가하였다. Ethylacetate 재추출물에서는 4000ppm을 첨가했을 때 배양 48시간까지 강한 항균활성이 지속되었고, 2000ppm과 1000ppm의 농도에서도 약한 항균활성이 나타났다.

### 2) *Staphylococcus aureus*에 대한 생육저해

은행나무 잎 추출물과 그 재추출물들의 *S. aureus*의 생육 특성에 미치는 영향은 Fig. 7에서 보는 바와 같았다. 특히 *S. aureus*은 다른 균주에 비해 모든 재추출물에서 항균효과가 높았다. Methanol 추출물에 대하여 4000ppm에서 약한 생육저해를 나타내었으며, n-hexane 재추출물과 chloroform 재추출물은 100ppm을 제외한 모든 농도에서 강한 항균활성이 배양 48시간까지 지속되었다. Ethylacetate 재추출물 또한 배양 48시간까지 첨가 농도에 따라 증가된 항균효과를 보였는데, 4000ppm에서는 균의 증식이 완전히 저해되었다. Butanol 재추출물, water 재추출물에서는 첨가 농도에 따라 증가된 항균 효과를 보이다가 배양 48시간에는 첨가된 농도 모두 비슷한 항균효과를 나타내었다.

### 3) *Salmonella typhimurium*에 대한 생육저해

실험에 사용된 추출물과 그 재추출물들이 *S. typhimurium*의 생육특성에 미치는 영향은 Fig. 8에 나타낸 바와 같았다. Methanol 추출물과 chloroform 재추출물, butanol 재추출물이 배양 48시간까지 4000ppm에서 약한 생육저해를 보였고 n-hexan 재추출물과 watar 재추출물에서는 생육저해가 나타나지 않았다. Ethylacetate 재추출물에서는 2000ppm에서 약한 항균효과와 4000ppm에서 비교적 강한 항균효과를 나타내었다.

### 4) *Listeria monocytogenes*에 대한 생육저해

실험에 사용된 추출물과 그 재추출물들이 *L. monocytogenes*의 생육특성에 미치는 영향은 Fig. 9에 나타낸 바와 같았다. Methanol 추출물과 butanol 재추출물에서 배양 48시간까지 4000ppm의 농도에서만 약한 항균효과를 보였고, chloroform 재추출물은 24시간이 되어서야 4000ppm에서 약한 항균효과를 보였다. Water 재추출물은 12시간까지 4000ppm에서 항균효과를 나타내었고, ethylacetate 재추출물에서는 배양 48시간까지 4000ppm에서 강한 생육저해를 나타내었다.

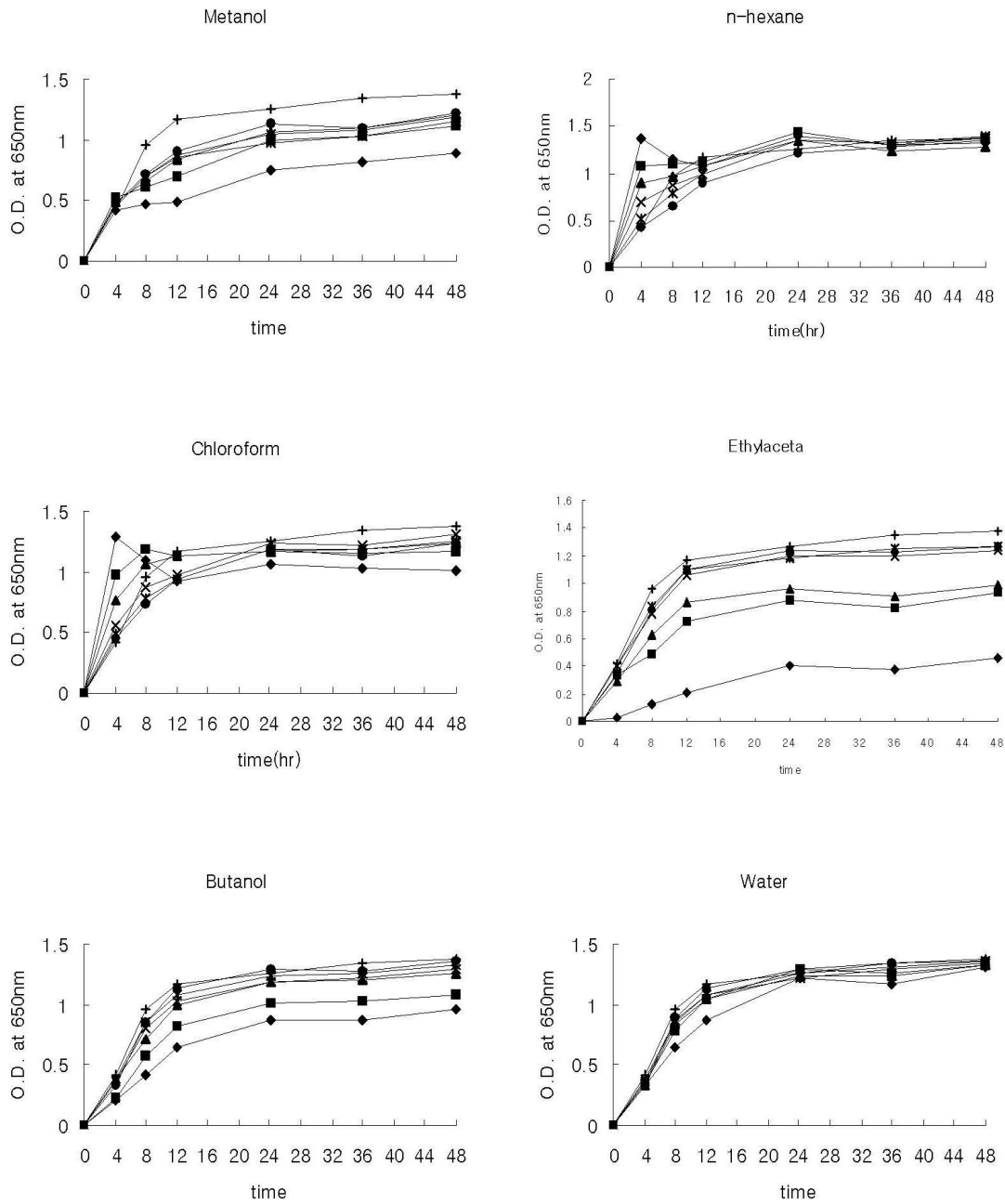
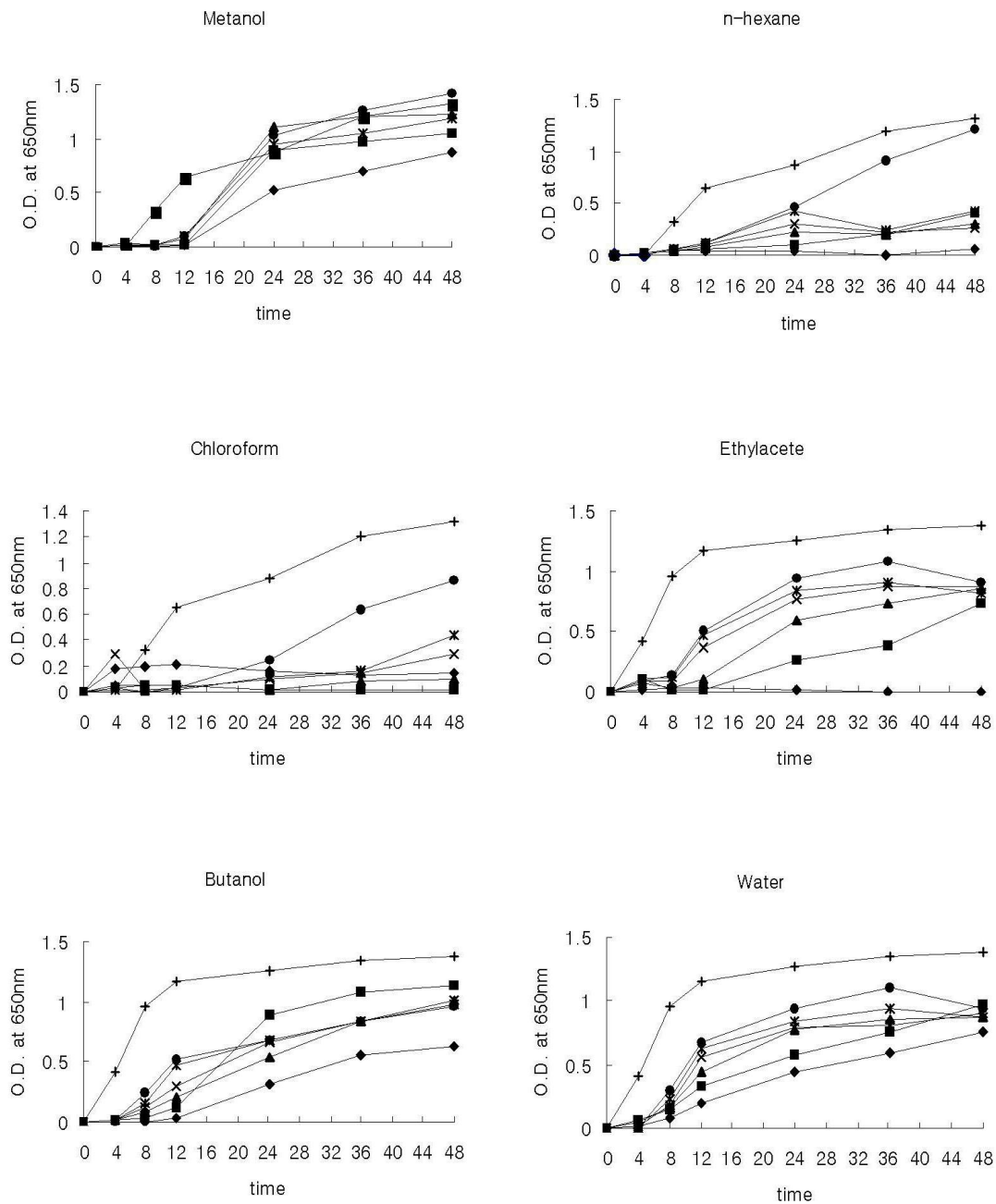


Fig. 6. Growth curves of *E. coli* in the media adding the extract and the solvent reextracts of *Ginkgo biloba* L. leaves.

◆ : 4000ppm    ■ : 2000ppm    ▲ : 1000ppm

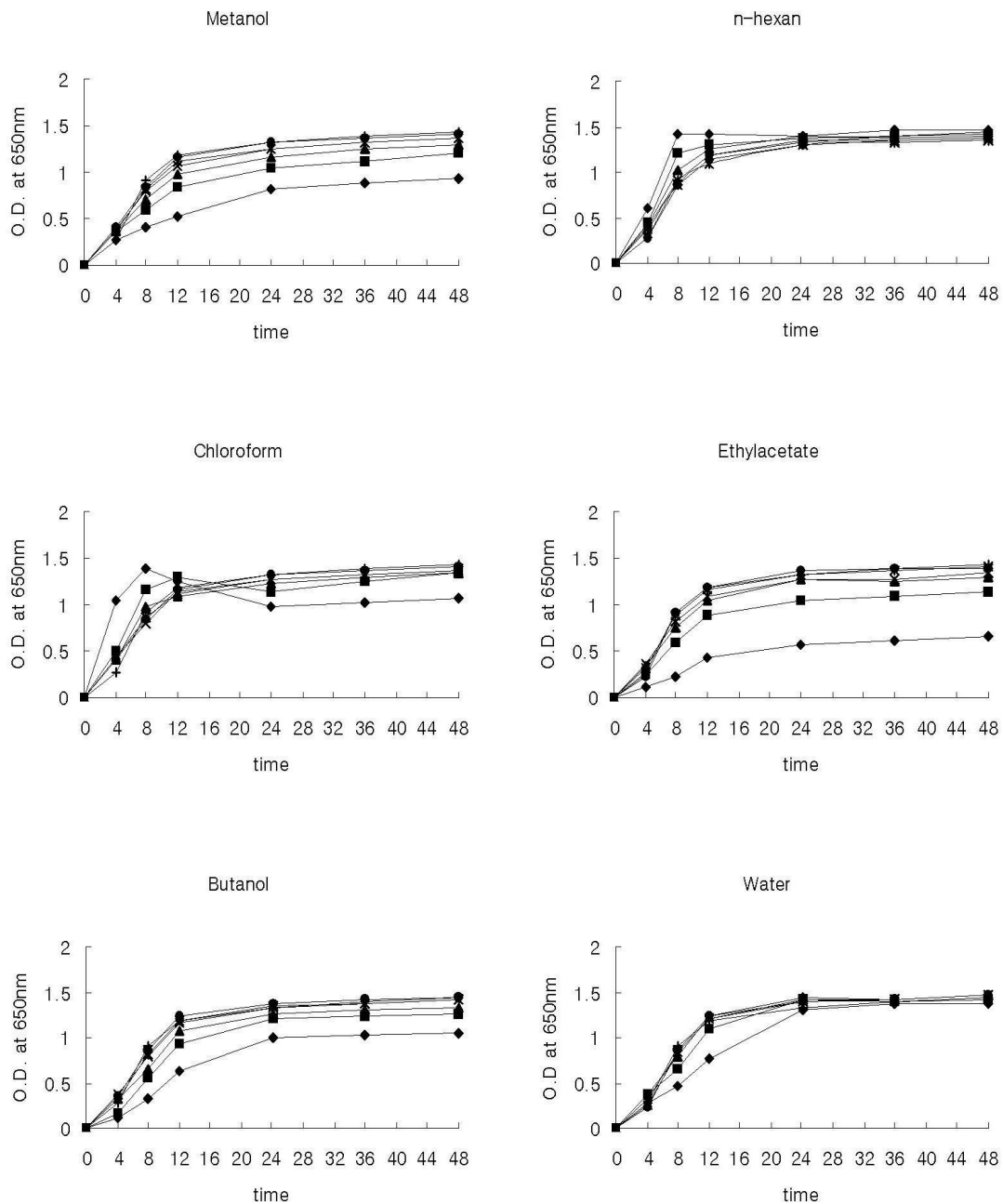
× : 500ppm    \* : 250ppm    ● : 100ppm    + : 0ppm



**Fig. 7. Growth curves of *S. aureus* in the media adding the extract and the solvent reextracts of *Ginkgo biloba* L. leaves.**

◆ : 4000ppm    ■ : 2000ppm    ▲ : 1000ppm

× : 500ppm    \* : 250ppm    ● : 100ppm    + : 0ppm



**Fig. 8. Growth curves of *S. typhimurium* in the media adding the extract and the solvent reextracts of *Ginkgo biloba* L. leaves.**

◆ : 4000ppm    ■ : 2000ppm    ▲ : 1000ppm

× : 500ppm    \* : 250ppm    ● : 100ppm    + : 0ppm

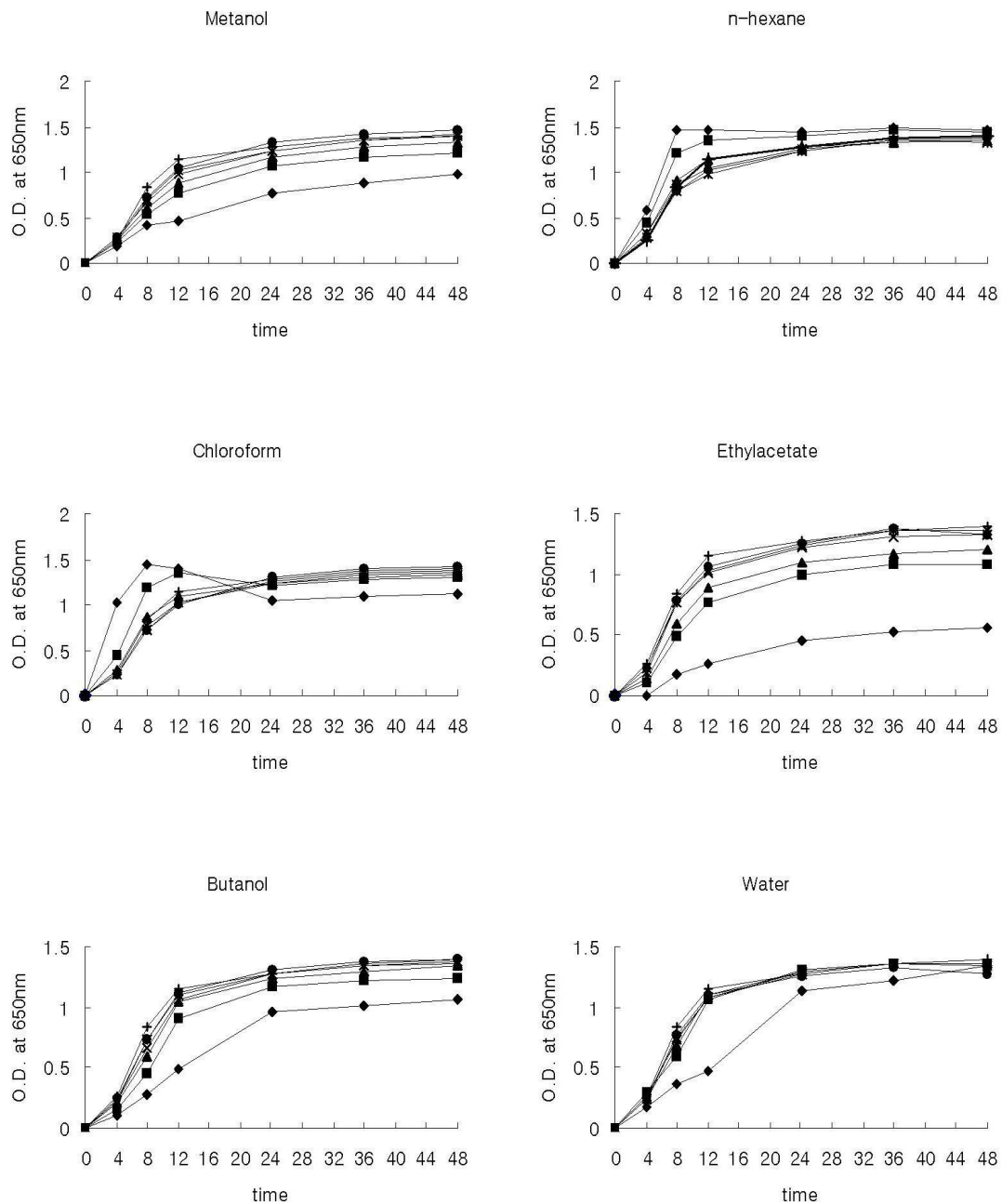


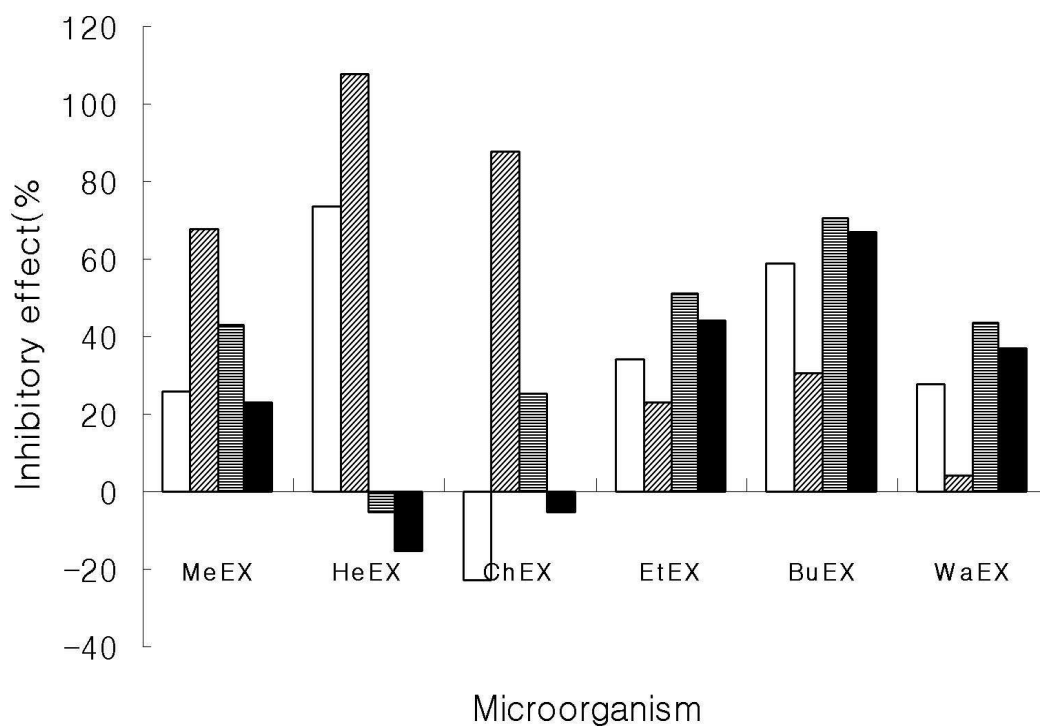
Fig. 9. Growth curves of *L. monocytogenes* in the media adding the extract and the solvent reextracts of *Ginkgo biloba* L. leaves.

◆ : 4000ppm    ■ : 2000ppm    ▲ : 1000ppm

× : 500ppm    \* : 250ppm    ● : 100ppm    + : 0ppm

## 5. 추출물과 재추출물의 미생물에 대한 생육 저해율

은행나무 잎 추출물과 재추출물들의 농도를 1000ppm으로 하여 TSB 배지에 첨가한 후 미생물에 대한 생육저해를 알아보기 위하여 흡광도를 측정 한 후 그 값을 식에 따라 생육저해율을 구한 결과는 Fig. 10와 같았다. 그 결과, methanol 추출물은 모든 균에 대하여 20%이상의 높은 생육 저해 효과를 나타내었고, 특히 *S. aureus*에 대하여는 60%이상의 높은 저해율을 나타내었다. 재추출물 중에서는 butanol 재추출물에서 *E. coli*, *S. typhimurium*, *L. monocytogenes*에 대하여 50%이상의 강력한 생육저해를 나타내었다. Ethylacetate 재추출물에서는 4종의 균주 모두에 대해, water 재추출물은 *S. aureus*를 제외한 3종의 균주에 대해 20%이상의 생육저해를 나타내었다. n-Hexane 재추출물은 *E. coli*에 대해 73.5%의 생육저해를 보였고, *S. aureus*에 대해서는 100%이상의 완전한 생육저해를 보였다 *S. typhimurium*와 *L. monocytogenes*에 대해서는 오히려 균주의 증식이 더 증가된 것을 볼 수 있었다. Chloroform 재추출물에서도 *E. coli*와 *L. monocytogenes*에 대해서 균주의 증식이 오히려 더 증가되었으나 *S. aureus*에 대해서는 87.53%의 높은 저해율을 보였다.



**Fig. 10.** Inhibitory effect of the extracts of *Ginkgo biloba* L. leaves against several microorganisms for 24 hr at 37°C.

□ : *E.coli*

▨ : *S. aureus*

▤ : *S. typhimurium*

■ : *L. monocytogenes*

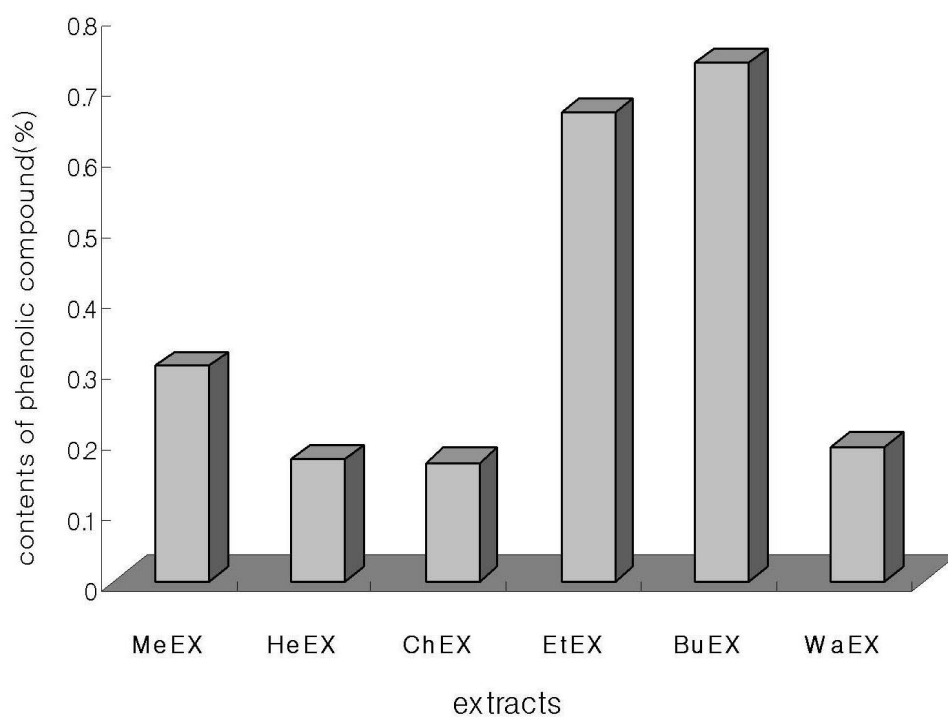
## 6. 추출물과 재추출물의 페놀성 화합물의 함량

은행나무 잎 추출물과 재추출물에 대한 페놀성 화합물의 함량에 대하여 검토한 결과를 Table 7과 Fig. 11에 나타내었다. Butanol 재추출물의 페놀성 화합물의 함량이 methanol 추출물 값의 2배 이상이 되는 0.732로 가장 높았는데, 최소저해농도로 알아본 butanol 재추출물의 항균활성이 아주 강했다는 결과와 비교해볼 때 페놀성 화합물의 함량이 많을수록 항균활성이 크게 나타난다는 최 등[85]의 결과와 일치하였다. 이에 근접한 페놀성 화합물의 함량이 ethylacetate 재추출물에서 보여졌고, 그 다음으로는 methanol 추출물, water 재추출물, n-hexane 재추출물, chloroform 재추출물 순으로 페놀성 화합물의 함량이 감소하였다.

식물의 세포에 존재하는 생리활성물질 중 페놀성 화합물들은 천연 항산화제로서 뿐만 아니라 항균성을 가지고 있다[86]. 이 페놀성 화합물 중 flavonoid는 생리 활성이 다양한 물질로서[87-89], 식물의 표피세포에 많이 함유되어 있기 때문에 자외선을 흡수해서 내부조직을 보호[90]할 뿐만 아니라 항균활성을 나타낸다고 하였다[91].

**Table 7. Contents of phenolic compound from the extracts of *Ginkgo biloba* L. leaves.**

Extracts	Contents of phenolic compound(%)
MeEX	0.303
HeEX	0.172
ChEX	0.167
EtEX	0.660
BuEX	0.732
WaEX	0.189



**Fig. 11.** Contents of phenolic compound from the extracts of *Ginkgo biloba* L. leaves.

## 7. 추출물과 재추출물의 안정성

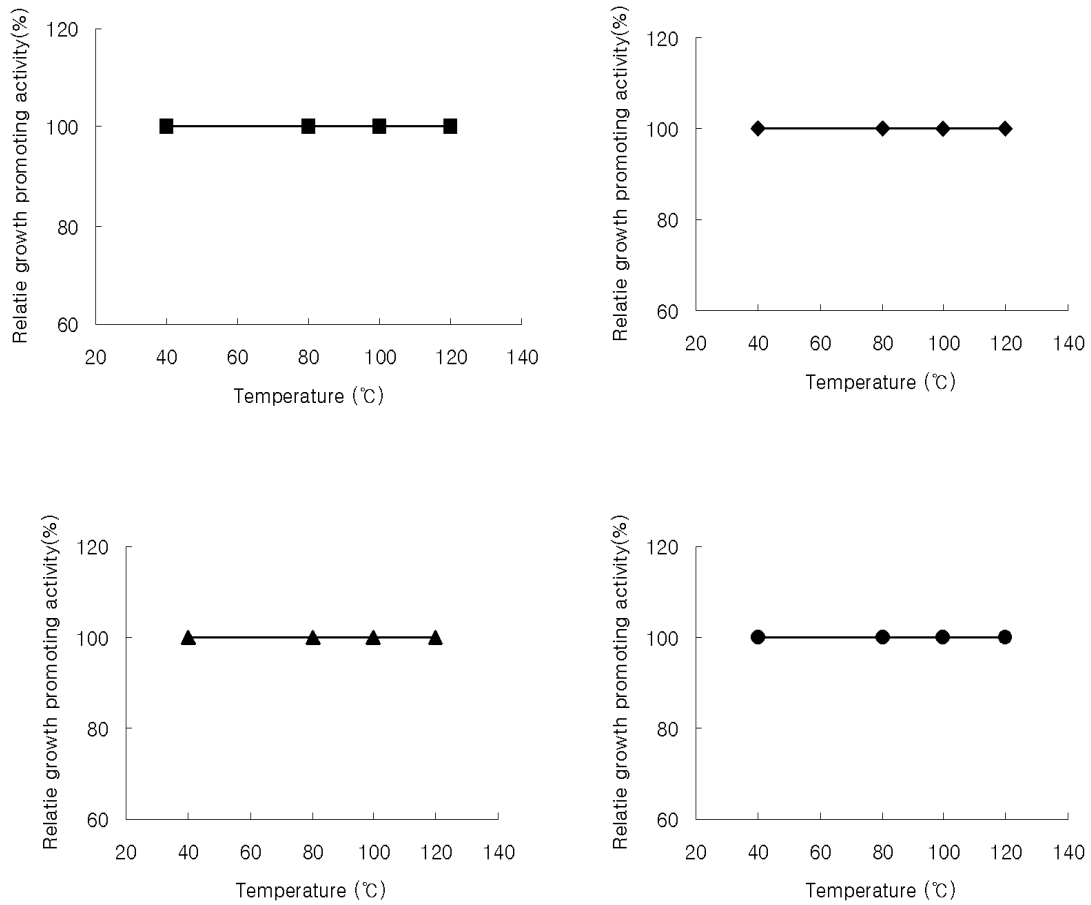
### 7.1 열 안정성

은행나무 잎의 methanol 추출물과 항균성이 좋았던 butanol 재추출물의 온도 변화에 대한 항균 활성을 조사하기 위하여 methanol 추출물과 butanol 재추출물의 농도를 1 mg/disc로 하여 40, 80, 100, 120℃에서 각각 1시간 동안 열처리 한 후 4종의 균주의 생육정도를 측정한 결과는 Fig. 12, 13과 같았다. 그 결과, 모든 열처리 군에서 열처리를 하지 않은 대조군과 차이가 없는 항균 활성을 확인하였다. 특히 120℃의 열처리에 의해서도 methanol 추출물에서 항균 활성이 있는 것으로 보아 은행나무 잎 추출물은 열에 매우 안정한 물질임을 알 수 있었다. 따라서 은행나무 잎 추출물은 열에 의한 가공 적성에서 항균 활성이 실활 되지 않을 것으로 판단된다.

### 7.2 pH 안정성

은행나무 잎의 methanol 추출물과 항균성이 좋았던 butanol 재추출물의 pH 변화에 대한 항균 활성을 조사하기 위하여 methanol 추출물과 butanol 재추출물의 농도를 1 mg/disc로 하여 pH를 2, 5, 7, 9, 11로 조절하고 1시간 동안 처리하여 4종의 균주에 대한 항균 효과를 조사한 결과는 Fig. 14, 15와 같다. Methanol 추출물은 모든 pH 조건에 대하여 pH 조절을 하지 않은 대조군과 비교시 항균 활성에 있어 차이가 나타나지 않아 pH 안정성이 매우 우수함을 알 수 있다. 한편, butanol 재추출물의 경우는 *E.coli*와 *L. monocytogenes*에 대하여는 pH를 2로 낮추었을 때 항균활성이 오히려 약 110%까지 증가하는 것을 보여 산성에 대해서는 안정한 반면, 강알칼리쪽으로 갈수록 항균활성이 낮아지는 경향을 나타내었다. 그러나 중성이나 알칼

리 부근에서도 활성을 거의 잃지 않고 비교적 높은 양상을 나타내었다. 신 [43]의 목본식물의 연구결과와 유사하게 은행나무 잎의 methanol 추출물, 그 중에서 butanol 재추출물 역시 넓은 pH spectrum을 보이는 것으로 나타나 기존의 합성 보존제와는 다른 기작을 가지고 있을 뿐 아니라, 은행나무 잎 추출물 첨가제가 pH 정도에 영향을 받지 않으므로 본래 식품의 맛과 성상 등을 변화시키지 않는다는 장점을 지니고 있어 이용도가 넓을 것으로 예상된다.



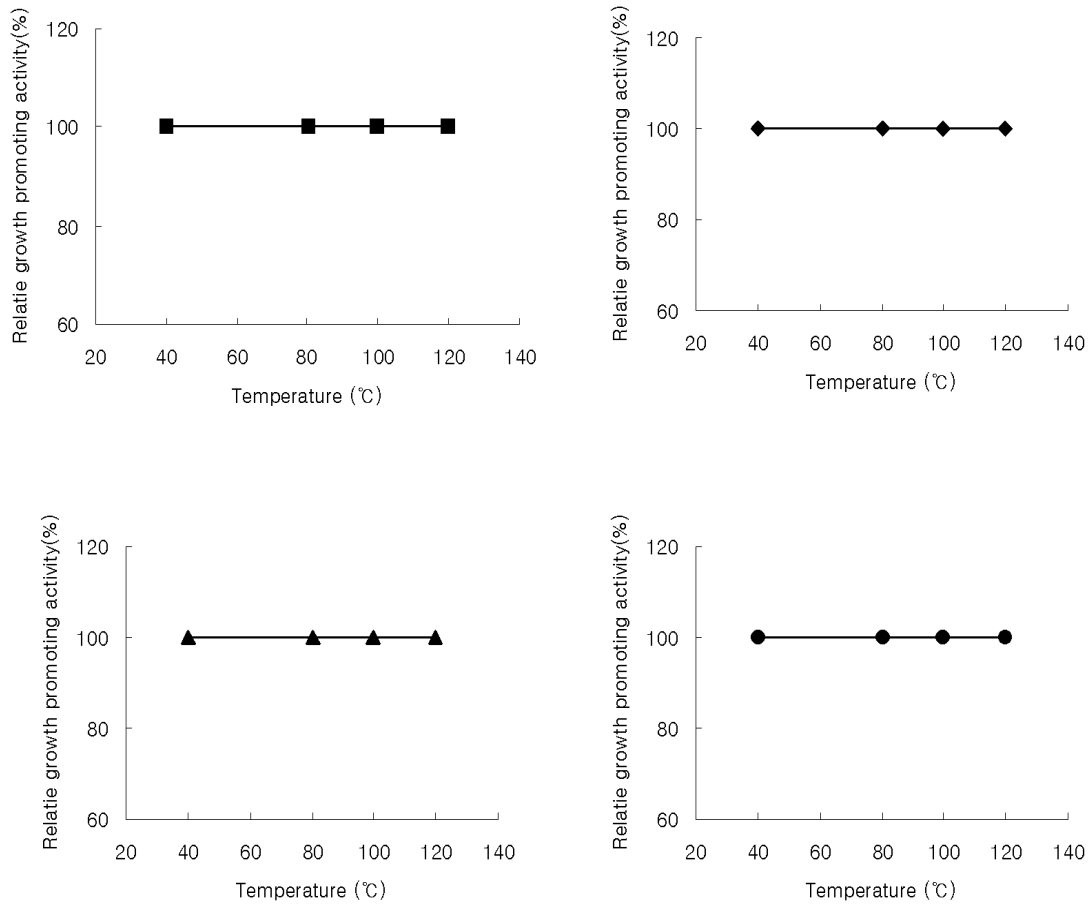
**Fig. 12. Relative growth promoting activity of the methanol extract of *Ginkgo biloba* L. leaves for several microorganisms at heat treatment.**

■ : *E.coli*

◆ : *S. aureus*

▲ : *S. typhimurium*

● : *L. monocytogenes*



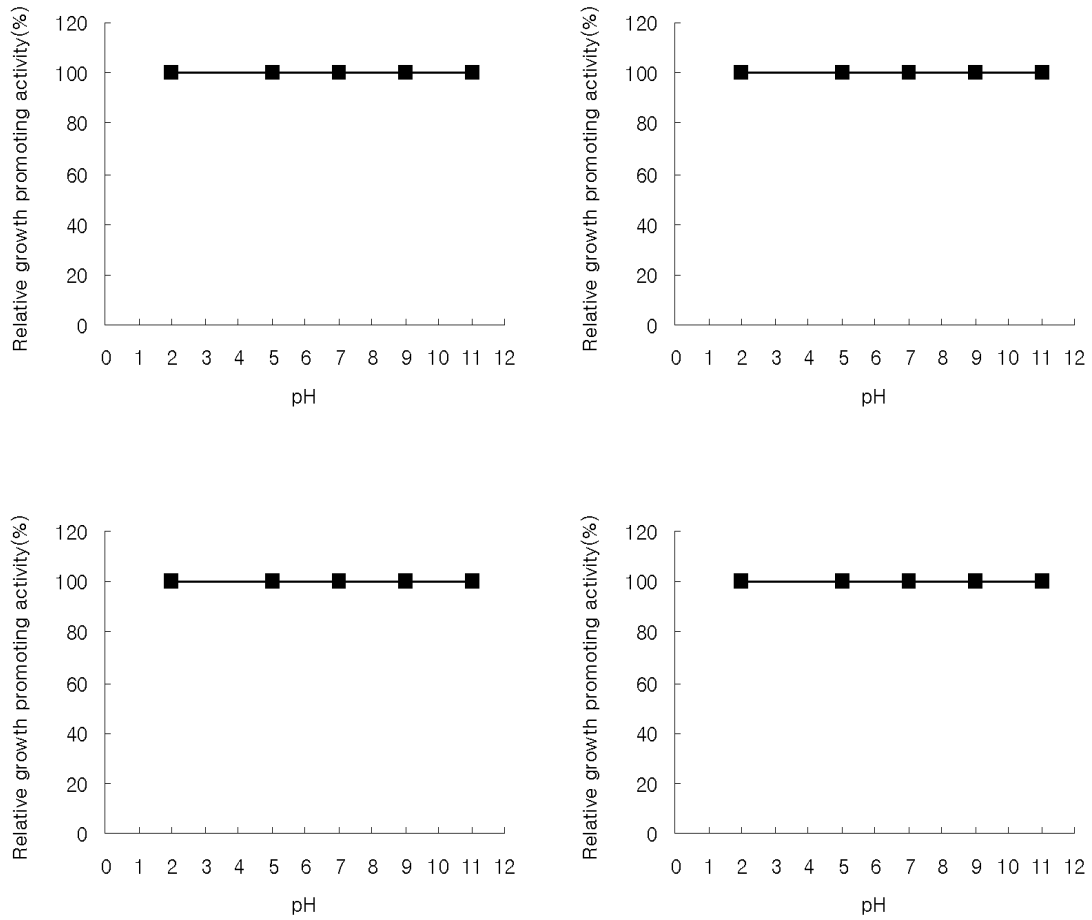
**Fig. 13. Relative growth promoting activity of the butanol reextract of *Ginkgo biloba* L. leaves for several microorganisms at heat treatment.**

■ : *E.coli*

◆ : *S. aureus*

▲ : *S. typhimurium*

● : *L. monocytogenes*



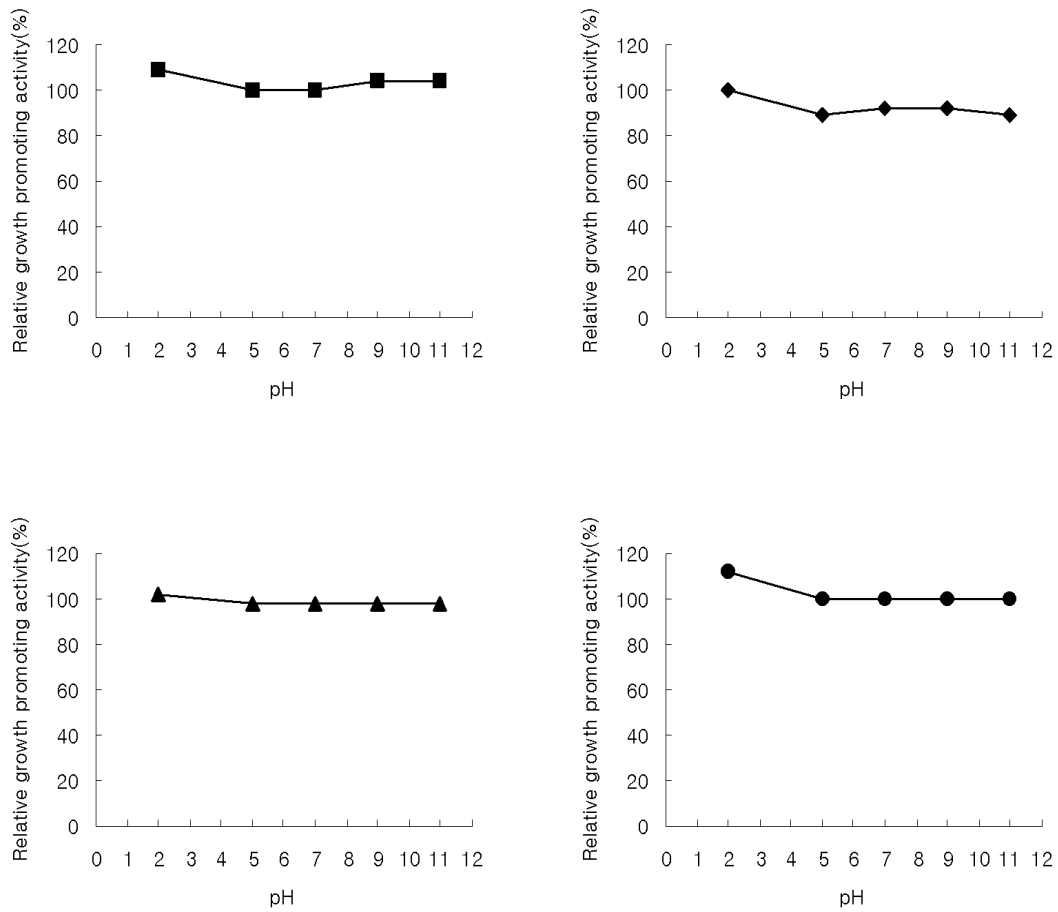
**Fig. 14. Relative growth promoting activity of the methanol extract of *Ginkgo biloba* L. leaves for several microorganisms at pH treatment.**

■ : *E.coli*

◆ : *S. aureus*

▲ : *S. typhimurium*

● : *L. monocytogenes*



**Fig. 15. Relative growth promoting activity of the butanol reextract of *Ginkgo biloba* L. leaves for several microorganisms at pH treatment.**

■ : *E.coli*

◆ : *S. aureus*

▲ : *S. typhimurium*

● : *L. monocytogenes*

## 8. 시판세제에의 응용

시판하는 주방용 세제에 은행나무 잎의 methanol 추출물을 농도별로 첨가하여 4종의 균주에 대한 항균효과는 Table 8~11와 Fig. 16~19에서 보는 바와 같았다. 특히 *E. coli*에 대하여 항균효과가 우수하였는데 즉, 500ppm의 methanol 추출물을 첨가한 군이 세제만 첨가한 군에 비해 16.15%, 1500ppm의 methanol 추출물을 첨가한 군은 0.08%( $1.0 \times 10^1$ CFU/ml)의 균수만이 잔존하였다. *S. aureus*에 대해서는 세제만을 첨가한 군에 비해 500ppm의 methanol 첨가군에서 약 49%, 1000ppm의 methanol 첨가군에서 약 34%, 1500ppm의 methanol 첨가군에서 약 0.12%의 균수만이 잔존하였다.

*S. typhimurium*에 대하여는 세제만을 첨가한 군에 비해 500ppm의 methanol 첨가군이 약 83%, 1000ppm의 methanol 추출물 첨가군이 약 58%, 1500ppm의 methanol 추출물 첨가군이 약 20%의 균수 잔존률을 보였다. *L. monocytogenes*는 1500ppm의 methanol 추출물을 첨가한 군이 세제만을 첨가한 군에 비해 5.29%의 균수만이 잔존하였다. 이로서 은행나무 잎의 methanol 추출물은 시판 세제의 항균 보강제로서의 이용가능성이 있음을 확인하였다.

**Table 8. Synergistic effect of antimicrobial activity of the detergent added methanol extract of *Ginkgo biloba* L. leaves preventing *E.coli* growth.**

Experimental condition	Viable count(CFU/ml)
Control	$3.1 \times 10^4$
Detergent only	$1.3 \times 10^4$
Detergent + 500 ppm Methanol Extract	$2.1 \times 10^3$
Detergent + 1000 ppm Methanol Extract	$2.2 \times 10^3$
Detergent + 1500 ppm Methanol Extract	$1.0 \times 10^1$

control : no detergent

**Table 9. Synergistic effect of antimicrobial activity of the detergent added methanol extract of *Ginkgo biloba* L. leaves preventing *S. aureus* growth.**

Experimental condition	Viable count(CFU/ml)
Control	$3.17 \times 10^3$
Detergent only	$4.1 \times 10^3$
Detergent + 500 ppm Methanol Extract	$2.1 \times 10^3$
Detergent + 1000 ppm Methanol Extract	$1.4 \times 10^3$
Detergent + 1500 ppm Methanol Extract	$5.0 \times 10^2$

control : no detergent

**Table 10. Synergistic effect of antimicrobial activity of the detergent added methanol extract of *Ginkgo biloba* L. leaves preventing *S. typhimurium* growth.**

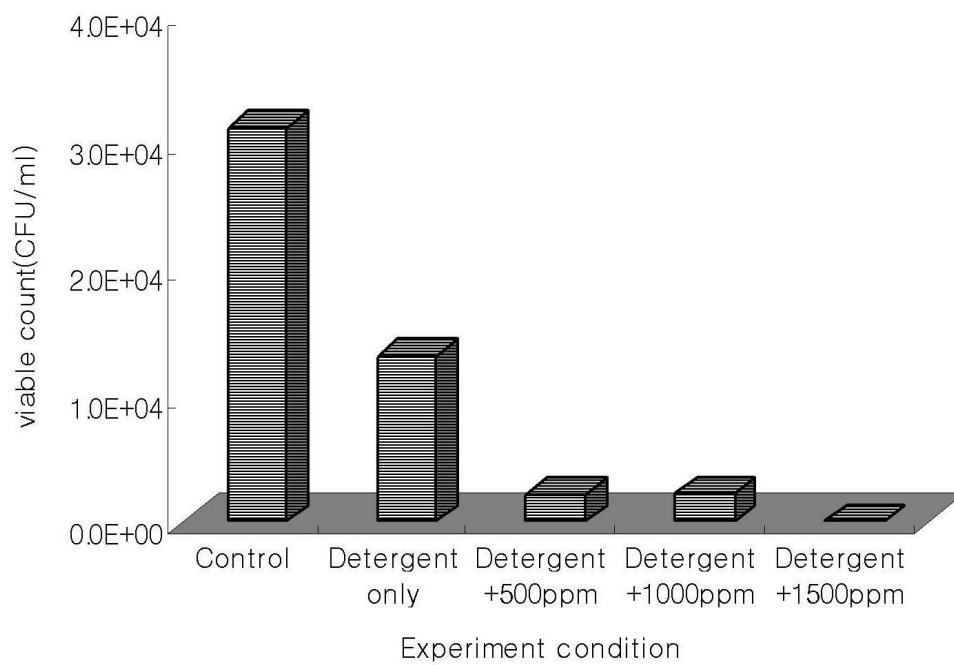
Experimental condition	Viable count(CFU/ml)
Control	$1.97 \times 10^3$
Detergent only	$1.37 \times 10^3$
Detergent + 500 ppm Methanol Extract	$1.14 \times 10^3$
Detergent + 1000 ppm Methanol Extract	$7.9 \times 10^2$
Detergent + 1500 ppm Methanol Extract	$2.8 \times 10^2$

control : no detergent

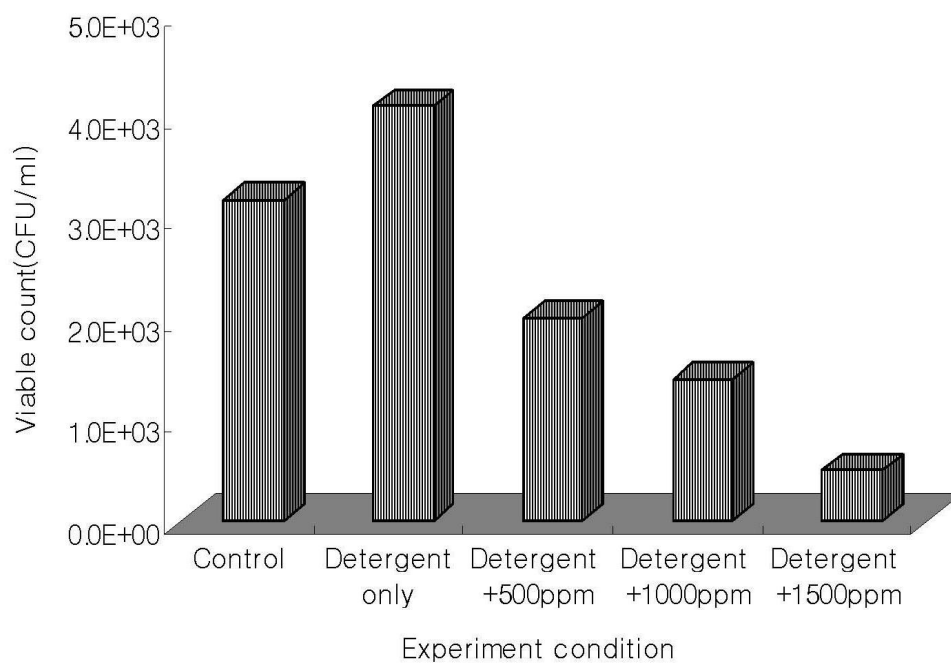
**Table 11. Synergistic effect of antimicrobial activity of the detergent added methanol extract of *Ginkgo biloba* L. leaves preventing *L.monocytogenes* growth.**

Experimental condition	Viable count(CFU/ml)
Control	$5.1 \times 10^5$
Detergent only	$1.5 \times 10^5$
Detergent + 500 ppm Methanol Extract	$1.64 \times 10^5$
Detergent + 1000 ppm Methanol Extract	$1.3 \times 10^5$
Detergent + 1500 ppm Methanol Extract	$2.7 \times 10^4$

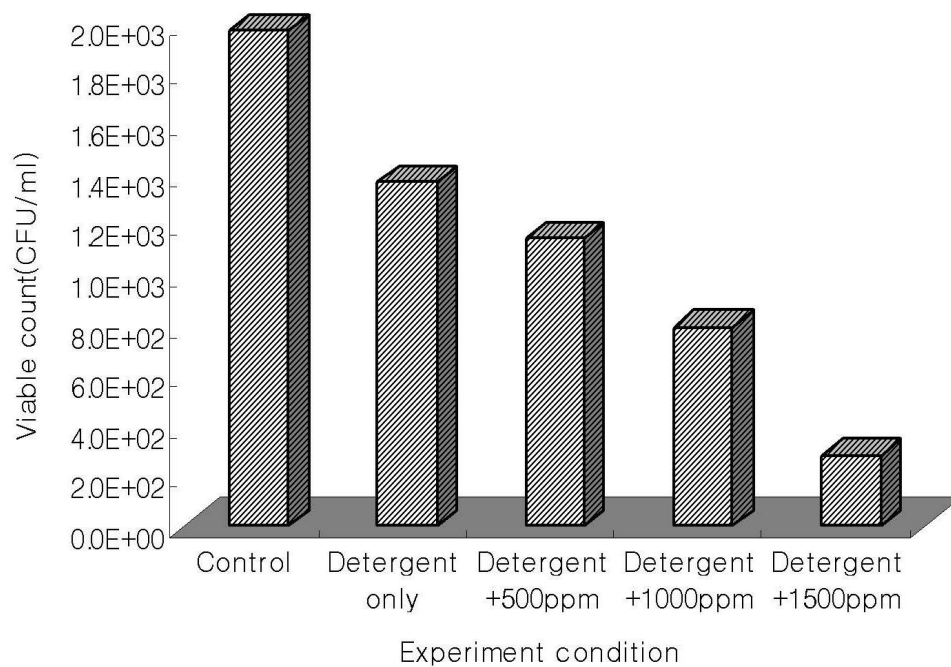
control : no detergent



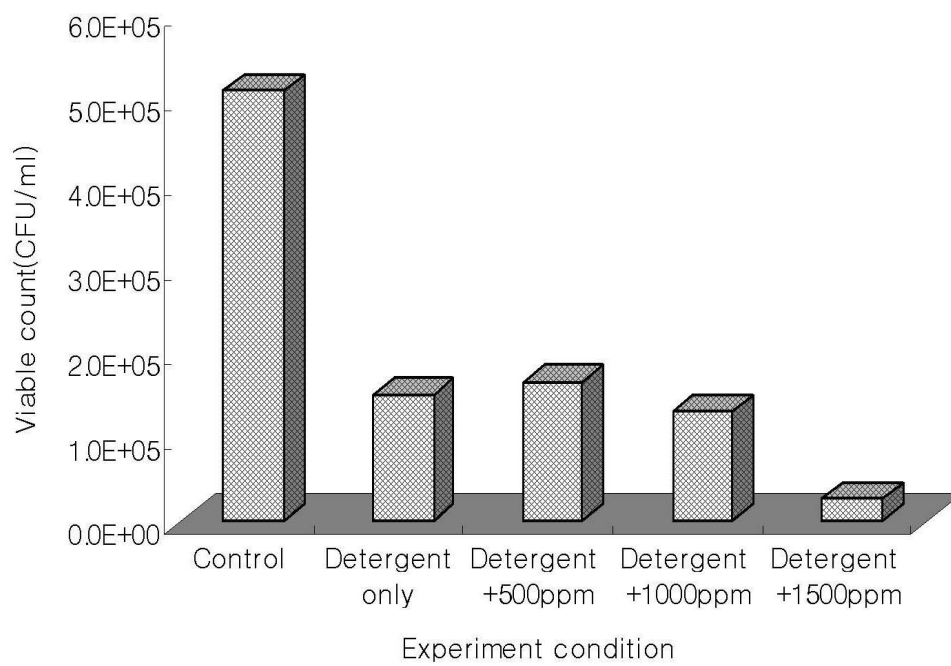
**Fig. 16. Synergistic effect of antimicrobial activity of the detergent added methanol extract preventing *E. coli* growth.**



**Fig. 17. Synergistic effect of antimicrobial activity of the detergent added methanol extract preventing *S. aureus* growth.**



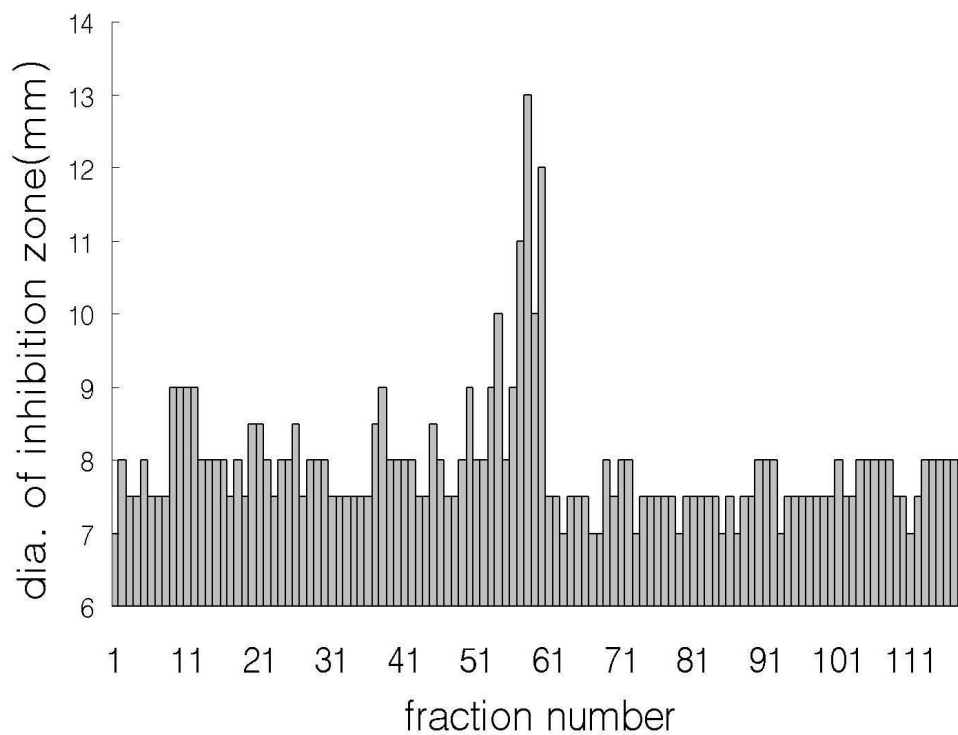
**Fig. 18. Synergistic effect of antimicrobial activity of the detergent added methanol extract preventing *S. typhimurium* growth.**



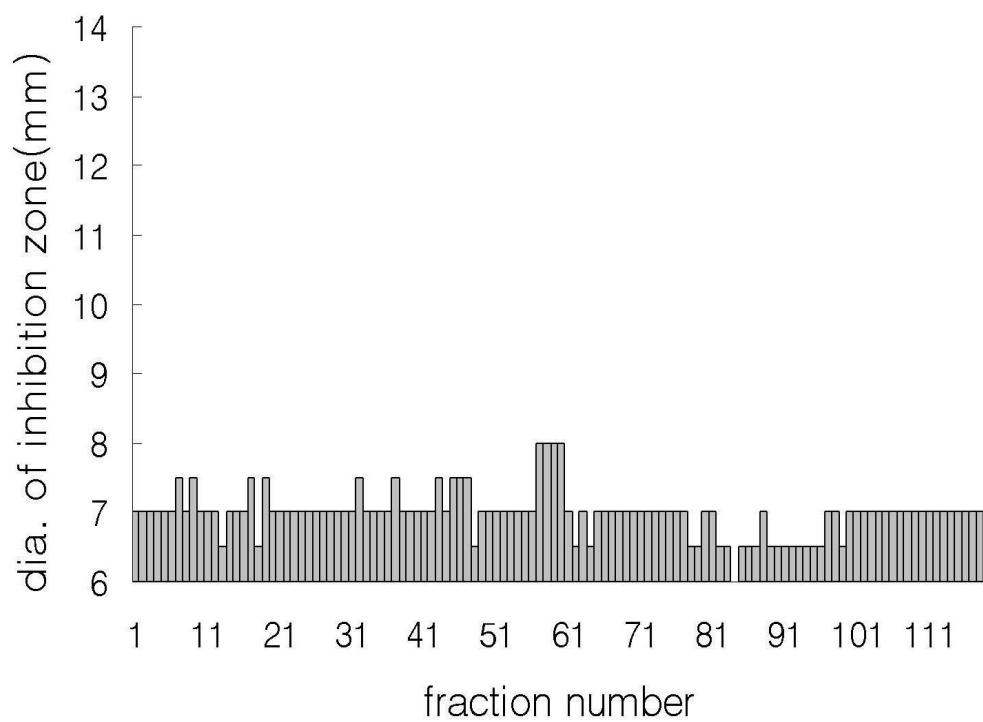
**Fig. 19. Synergistic effect of the detergent and methanol extract preventing *L. monocytogenes* growth.**

## 9. Silica gel column chromatography

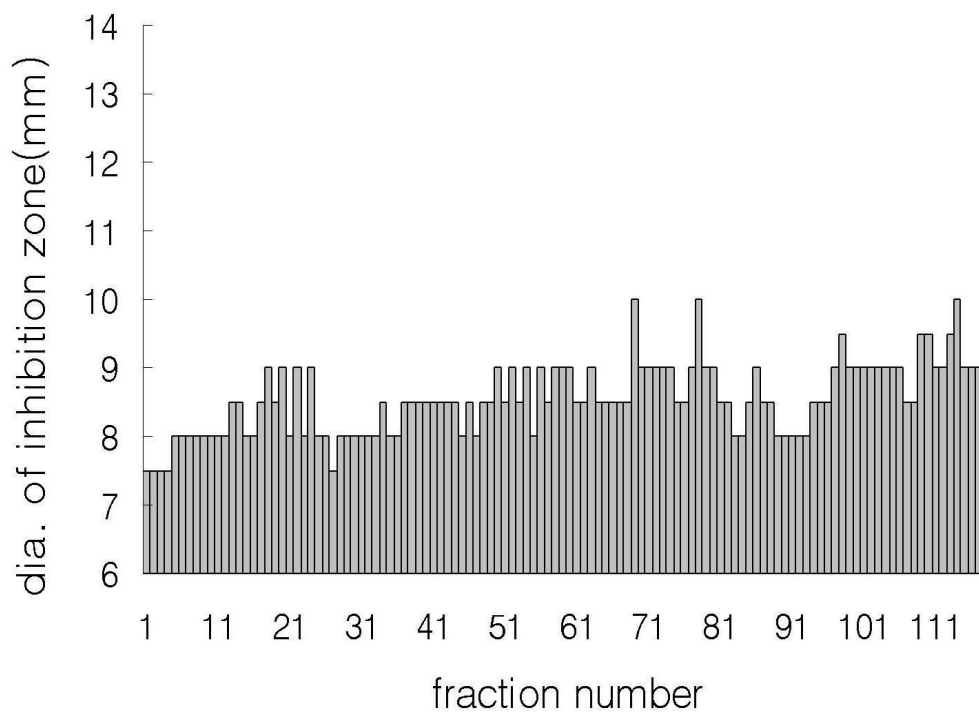
항균활성이 강한 재추출물의 유효성분을 검색할 목적으로 butanol 재추출물 20g을 silica gel column chromatography를 행하여 118개의 분획을 얻어 4종의 균주에 대한 항균력을 측정된 결과는 Fig. 20~23과 같았다. *E. coli*에 대해서는 54, 59번 분획이 10mm, 57번 분획이 11mm, 60번 분획이 12mm, 58번이 13mm로 강한 항균력을 보였다. 이와 같은 결과로 58번 분획의 항균력이 butanol 재추출물 보다 약 2.5배 정도 항균활성이 높아졌음을 확인하였다. *S. aureus*에 대해서는 57~60번 분획이 8mm의 항균력을 보임으로써 butanol 재추출물보다 약한 항균활성의 증가를 보였다. *S. typhimurium*에 대해서는 butanol 재추출물에 비해 전체적으로 항균성의 약한 증가를 보였고, 특히 69, 78, 114번의 분획이 10mm의 강한 항균활성을 보였다. *L. monocytogenes*에 대해서도 butanol 재추출물에 비해 항균활성의 약한 증가를 보였는데, 특히 18번 분획은 10mm, 57번 분획과 60번 분획은 11mm, 59번 분획은 12mm로 항균활성의 높은 증가를 보였다.



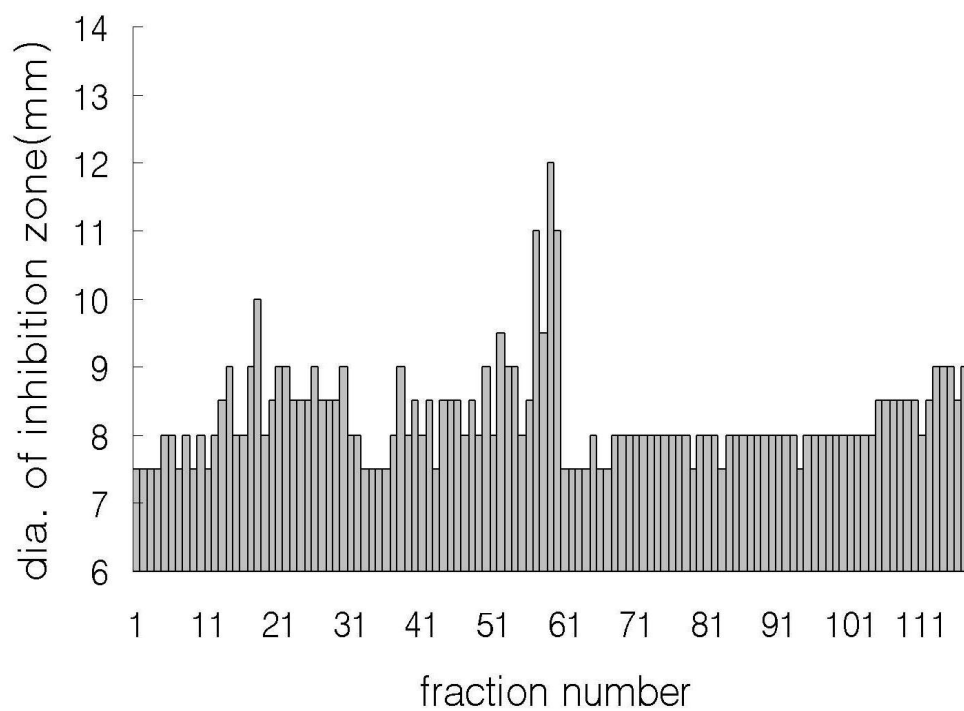
**Fig. 20. Antimicrobial activity against *E. coli* of the fractions of the butanol reextract fractionated by the silica gel column chromatography.**



**Fig. 21. Antimicrobial activity against *S. aureus* of the fractions of the butanol reextract fractionated by the silica gel column chromatography.**



**Fig. 22. Antimicrobial activity against *S. typhimurium* of the fractions of the butanol reextract fractionated by the silica gel column chromatography.**



**Fig. 23. Antimicrobial activity against *L. monocytogens* of the fractions of the butanol reextract fractionated by the silica gel column chromatography.**

## 10. Thin Layer Chromatography

Butanol 재추출물을 silica gel column chromatography를 행하여 항균활성이 크게 나타난 분획물들의 thin layer chromatography(TLC)로 Fig. 24와 같은 chromatogram을 얻었다. Rf 0.53에서 공통적인 물질군이 나타나고 있으나 Fig. 18~21에서 보는 바와 같이 항균활성이 강했던 분획 49~60번 부근에서 Rf 0.38의 물질군이 나타나 이 물질이 주 항균성 물질로 생각되었다.

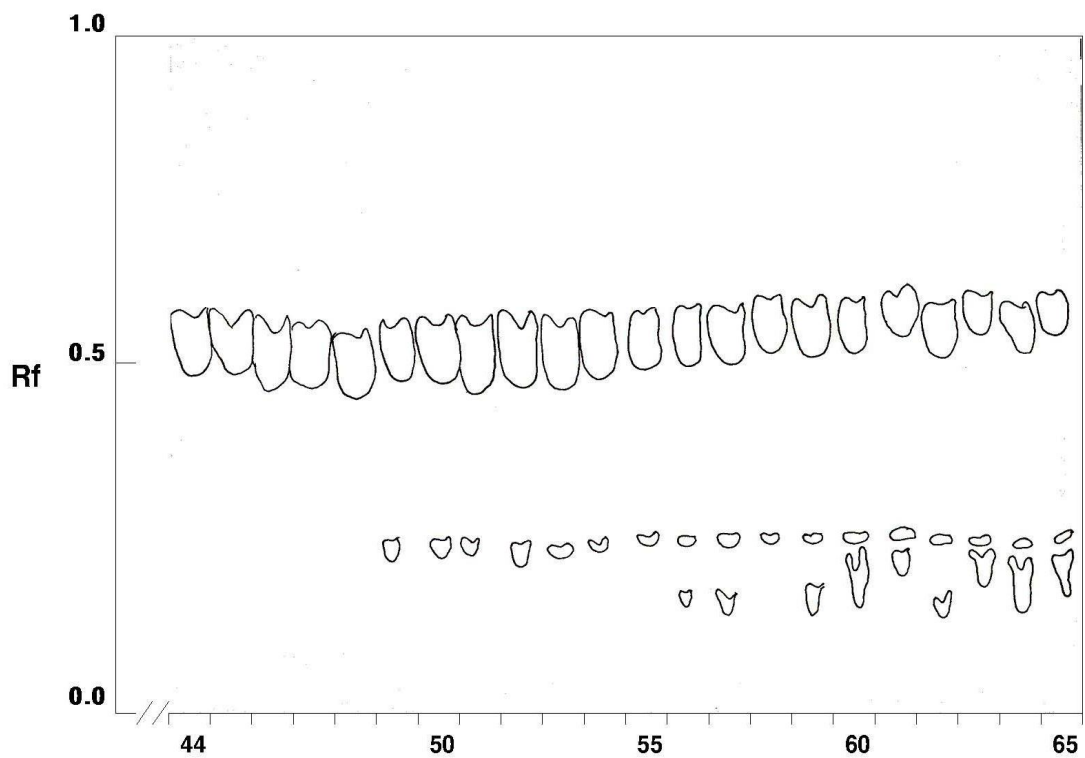


Fig. 24. Thin layer chromatogram of antimicrobial activity fraction(44~65 in number) of the butanol fraction separated by the silica gel column chromatography shown Fig. 20~23.

## IV. 결 론

본 연구는 천연 항균 소재를 탐색하기 위한 목적으로 국내에 자생하는 은행나무(*Gingko biloba* L.) 잎의 methanol 추출물을 용매별로 순차분획하여 4종의 식품 유해 미생물(*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*)에 대한 항균활성을 paper disc 법으로 살펴보았으며, 그 추출물과 재추출물의 최소저해 농도(Minimum inhibitory concentration, MIC), 생육곡선, 24시간에서의 생육저해율, 페놀성 화합물의 함량 측정, 열과 pH에 대한 안정성을 확인하였다. 나아가 현재 시판되는 주방 세제에의 첨가 효과를 살펴보았다. 한편 항균성 물질을 분리하기 위해 항균성이 높았던 butanol 재추출물을 선택하여 silica gel column chromatography, thin layer chromatography(TLC)를 실시하였으며, 이상의 실험들을 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 은행나무 잎의 methanol 추출물의 수율은 24.35 %이었다. 용매별 재추출물의 수율은 water 재추출물, chloroform 재추출물, butanol 재추출물이 각각 40.19%, 18.21%, 16.05%였다. 반면, n-hexane 재추출물과 ethylacetate 재추출물은 각각 8.6%, 4.64%로 10% 미만의 수율을 나타내었다.

2. Paper disc 법을 사용하여 조사한 용매별 항균효과는 methanol 추출물이 4종의 시험균주 모두에서 약 7.5mm로 비슷한 항균효과를 나타내었다. Ethylacetate 재추출물과 butanol 재추출물, water 재추출물은 *E.coli*에 대하여 9mm의 강한 항균효과를 나타내었고, *S. typhimurium*에 대하여는 8mm의 항균효과를 보였다.

3. Broth microdilution 법을 시행하여 균의 최소저해 농도(MIC)를 측정한 결과에서 butanol 재추출물의 항균활성이 *E. coli*와 *S. typhimurium*, *L. monocytogenes*에 대하여 62.5 $\mu$ g/ml, *S. aureus*에 대하여는 32.15 $\mu$ g/ml로 상당히 낮은 MIC 값을 나타내었다.

4. 은행나무 잎 methanol 추출물과 용매별 재추출물을 농도별로 처리한 균들의 생육도를 균주별로 조사한 결과, 4종의 균주에 대하여 methanol 추출물과 ethylacetate 재추출물, butanol 재추출물이 첨가농도에 따라 항균효과가 상승하였다. 특히 ethylacetate 재추출물에서는 첨가된 농도 모두에서의 항균효과가 배양 48시간까지 지속되었다.

5. 24시간에서의 생육 저해율을 확인한 결과, methanol 추출물은 모든 균에 대하여 20%이상의 높은 생육 저해 효과를 나타내었고 특히 *S. aureus*에 대하여는 60%이상의 높은 저해율을 나타내었다. 재추출물 중에서는 butanol 재추출물에서 *E. coli*, *S. typhimurium*, *L. monocytogenes*에 대하여 50%이상의 생육저해를 나타내었다. Ethylacetate 재추출물에서는 4종의 균주 모두에 대해, water 재추출물은 *S. aureus*를 제외한 3종의 균주에 대해 20%이상의 생육저해를 나타내었다. n-Hexane 재추출물은 *E. coli*에 대해 74%의 생육저해를 보였고, *S. aureus*에 대해서는 100%이상의 강력한 생육저해를 보였다. Chloroform 재추출물에서도 *S. aureus*에 대해서 88%의 높은 저해율을 보였다.

6. 은행나무 잎 추출물과 재추출물에 대한 페놀성 화합물의 함량에 대하여 검토한 결과 butanol 재추출물의 페놀성 화합물의 함량이 methanol 추출물의 2배 이상이 되었다. Ethylacetate 재추출물에서도 이와 유사한 페놀성 화합물 값을 나타내었고, methanol 추출물, water 재추출물, n-hexane 재추출물

출물, chloroform 재추출물 순으로 페놀성 화합물 함량이 감소하였다.

7. 은행나무 잎의 methanol 추출물과 butanol 재추출물의 농도를 1 mg/disc로 하여 40, 80, 100, 120℃에서 각각 1시간 동안 열처리 한 후 *S. typhimurium*의 생육정도를 측정한 결과, 모든 처리구에서 대조구와 차이가 없는 항균활성을 보였는데, 특히 120℃의 처리에 의해서도 methanol 추출물에서 항균활성이 있는 것으로 나타나 열에 매우 안정한 물질임을 알 수 있었다.

8. 은행나무 잎의 pH 변화에 대한 항균력의 안정성을 조사하기 위하여 methanol 추출물과 butanol 재추출물의 농도를 1 mg/disc로 하여 pH를 2, 5, 7, 9, 11로 조절한 후 *S. aureus*의 생육정도를 조사한 결과 methanol 추출물은 모든 pH 조건에 대하여 대조구와 비교시 항균활성에 있어 차이가 나타나지 않아 pH 안정성이 매우 우수함을 알 수 있었고, butanol 재추출물은 산성에 대해서는 안정한 반면, 강알칼리쪽으로 갈수록 활성이 낮아지는 경향을 나타내었다.

9. 시판 주방용 세제에 methanol 추출물을 농도별로 첨가하여 4종의 균주에 대한 항균효과를 확인한 결과 특히 *E. coli*에 대하여 항균효과가 우수하였다. 즉, 500ppm의 추출물을 첨가한 군이 세제만 첨가한 군에 비해 약 16.15%, 1500ppm의 추출물을 첨가한 군은 0.08%( $1.0 \times 10^1$ CFU/ml)의 균수만이 잔존하였다. *S. aureus*에 대해서는 세제만을 첨가한 군에 비해 500ppm 첨가군에서 약 49%, 1000ppm 첨가군에서 약 34%, 1500ppm 첨가군에서 약 0.12%의 균수만이 잔존하였다. *S. typhimurium*에 대하여는 세제만을 첨가한 군에 비해 500ppm 첨가군이 약 83%, 1000ppm 첨가군이 약 58%, 1500ppm 첨가군이 약 20%의 잔존률을 보였다. *L. monocytogens*에 대해서는 1500ppm

의 추출물을 첨가한 균이 세제만을 첨가한 균에 비해 5.29%의 균수만이 잔존하여 뚜렷한 항균효과를 나타내었다.

10. 항균활성이 강한 재추출물로부터 유효성분을 검색할 목적으로 butanol 재추출물을 silica gel column chromatography를 행하여 118개의 분획을 얻어 항균력을 측정한 결과 대체로 49~60번의 분획이 4종의 균주에 대해 증가된 항균활성을 보였다.

11. silica gel column chromatography를 행하여 항균활성이 크게 나타난 분획물들의 TLC chromatogram을 얻었다. Rf 0.53에서 공통적인 물질균이 나타나고 있으나 항균활성이 강했던 분획 49~60번 부근에서 Rf 0.38의 물질균이 나타나 이 물질이 주 항균성 물질로 생각되었다.

# References

1. 오덕환, 함승시, 박부길, 안 철, 유진영, 식품부패 및 병원성미생물에 대한 천연약용식물 추출물의 항균효과, Korean J. Food Sci. Technol., 30(4), 957-963 (1998)
2. 안용선, 신동화, 백남인, 운향으로부터 *Listeria monocytogenes*에 대한 항균 활성 물질의 분리 및 구조동정, Korean J. Food Sci. Technol., 32(6), 1379-1388 (2000)
3. 장동석, 신동화, 정덕화, 김창민, 이인선, 자세히 쓴 식품위생학, 58, 정문각
4. 박희옥, 김창민, 우건조, 박선희, 이동화, 장은정, 박기환, 최근 한국에서 발생한 식중독 모니터링 및 추이 분석, J. Fd Hyg, Safety, 16(4), 280-294 (2001)
5. Beuchat, L.R., Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces applied to lettuce and effectiveness of chlorinated water as disinfectant, J. Food Prot., 62, 845-849 (1999)
6. Castillo, A., Lucia, L.M., Kemp, G.K., and Acuff G.R., Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* on beef carcass surfaces using acidified sodium chlorite, J. Food Prot., 62, 580-584 (1999)
7. Venkitanarayanan, K.S., Ezeike, G.O.I., Hung Y.C. and Doyle, M.P., Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on plastic kitchen cutting boards by electrolyzed oxidizing water, J. Food Prot., 62, 857-860 (1999)
8. Sapers, G. M., Miler, R.L. and Mattazzo, A. M. Effectiveness of sanitizing agents in inactivating *Escherichia coli* in golden delicious apples. J. Food Sci., 62, 734-737 (1999)

9. Taormina, P.J. and Beuchat, L.R., Behavior of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa sprouts during the sprouting process as influenced by treatments with various chemicals, *J. Food Prot.*, 62, 850-856 (1999)
10. Kang, D.H. and Fung D.Y.C, Effect of diacetyl controlling *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in the presence of starter culture in a laboratory medium and during meat fermentation, *J. Food, Prot.*, 62, 975-979 (1999)
11. Larocco K.A. and Martin S. E, Effects of potassium sorbate alone and in combination with sodium chloride on the growth of *Salmonella typhimurium* 7136, *J. Food Sci.*, 46, 568-570 (1981)
12. Stecchini M.L., Luch R.D., Bortolussi G. and Deltorre M, Evaluation of lactic acid and monolaurin to control *Listeria monocytogenes* on stacchino cheese, *Food Microbiol.*, 13, 483-488 (1996)
13. Thayer D.W., Boyd G., Kim A., Fox J.B. and Farrell H.M, Fate of gamma-irradiated *Listeria monocytogenes* during refrigerated storage on raw of cooked turkey breast meat, *J. Food Prot.*, 61, 979-987 (1998)
14. 芝崎勲, 抗菌性天然添加物開發の現状と使用上の問題點, 25, 25-28 新食産業 (1983)
15. 장대식, 박기훈, 이종록, 하태정, 박윤배, 남상해, 양민석, 지칭개, 구절초 및 산국에서 분리한 Sesquiterpene lactons의 항균활성, 한국농화학회, 42(2), 176-179 (1999)
16. 박옥연, 장동석, 조학래, 한약재 추출물의 항균효과 검색, 한국영양식량학회지 21(1):91-96 (1992)
17. Beuchat, L. R. and Golden, D. A., Antimicrobials occurring naturally in

- foods., *Rood Technol.*, 43, 143 (1989)
18. Lee, K.H., T. Ibuka, R.Y. Wu, and T.A. Geissman., Structure antimicrobial activity relationships among the sesquiterpene lactons and related compounds, *Phytochemistry*, 16, 1177-1181 (1977)
  19. Mitscher, L.A., Y.H. Park, and D. Clark, Antimicrobial agents from higher plants, antimicrobial isoflavonoids and related substances from *Glycyrrhiza glabra* L. var *Typica*, *J. Nat. Prod.* 43, 259-269 (1980)
  20. Ismaiel, a and Pierson, M.D., Ingibition of growth & Germination of *C.botulinum* 33A, 40B and 1623E by essential oil of spices, *J. Food Sci.*, 55, 6 (1990)
  21. Shelef, L.A. Naglik, O.A. and Bojen, D.W., Sensitivity of some common food-borne bacteria to the spices sage, rosenary and allspice, *J. Food Sci.*, 45, 104 (1980)
  22. Conner, D.E. and beuchat, L.R., Effect of esential oils from plants on growth of food spoilage yeast, *J. Food Sci*, 49, 429 (1990)
  23. Al-Delaimy, K.S. and ali, U.P., Antibacterial action of vegetable extracts on the growth of pathogenic bacteria, *J. Food Sci., Agric*, 21, 110 (1970)
  24. Singh, H.B. and singh, U.P., Inthbition of growth and sclerotium formation in *Rhizoctonia solani* by garlic oil, *Mycologia*, 72, 1022 (1980)
  25. Muroi, H. and Kubo, I., combination effects of antibacterial compounds in green tea flavor against *Streptococcus mutans*, *J. Agric. Food Chem.*, 41, 1102 (1993)
  26. Kubo, I, Muroi, H. and Himejima, M., Antibacterial activity against *Streptococcus mutans* of Mate tea flavor compounds, *J. Agric. Food Chem.*, 41, 107 (1990)
  27. Mattews, P.D. and Haas, G.J., Antimicrobial activity of some edible plants:

- Lotus(*Nelumbo nucifera*), coffee, and others, *J. Food Prot.*, 56, 44 (1993)
28. Murio, H. Kubo, A and Kubo, I, antimicrobial activity of cashew apple flavor compounds, *J. Agric. Food Chem.*, 41, 1106 (1993)
  29. Pulusani, S.R., Rao, D.R. and Sunki, G.R., Antimicrobial activity of lactic cultures: Partial purification and characterization of antimicrobial compound produced by *Streptococcus thermophilus*, *J. Food Sci.*, 44, 575 (1979)
  30. Abdel-bar, N., Harris, N.D., and Rill, R.L., Purification and properties of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus bulgaricus*, *J Food Sci.*, 52, 411 (1987)
  31. spelhaug, S.R., and Harlander, S.K., Ingibition of food borne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus Pentosacceous*, *J. Food Prot.*, 52, 856 (1989)
  32. Okereke, A and Montville, T.J., Bacteriocin inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria, *J. Food Prot.*, 54, 349 (1991)
  33. Daeschel, M.A., antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives, *Food Technol.*, 43, 164 (1989)
  34. Papineau, A.M., Hoover, D.G., Knorr, D., and Farkas, D.F., Antimicrobial effect of water-soluble chitosans with high hydrostatic pressure. *Food Biotechnol.*, 5, 45 (1991)
  35. Ralston, G.B., Tracey, M.V., Wrench, P.N., The inhibition of fermentation in baker's yeast by chitosan, *Biochim. Biophys. Acta*, 93, 652 (1964)
  36. 유영선, 박기문, 김영배, 생약재 및 향신료의 *Streptococcus mutans* 증식억제 효과, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol*, 21, 187 (1993)
  37. Yamaki, M., Asogawa, T., Kashihara, M., Screening for antimicrobial action of Chinese crude drug and active principles of Hu zhang.

*Shoyakugaku Zasshi.*, 45, 153 (1988)

38. 한지숙, 신동화, 윤세억, 김문숙, *Listeria monocytogenes*의 증식을 억제하는 식용가능한 식물추출물의 검색, *한국식품과학회지*, 26, 200 (1991)
39. 박옥연, 장동석, 조학래, 한약재의 추출물의 항균효과 검색, *한국식품과학회지*, 21, 91 (1992)
40. 이병완, 신동화, 식품부패 미생물의 증식을 억제하는 천연항균성물질의 검색, *한국식품과학회지*, 23, 200 (1991)
41. Chen, c.P., Lin, C.C. and Namba, T., Development of natural crude rug resources from Taiwan (VII), *Shoyakugaku Zasshi.*, 41, 215 (1987)
42. Clark, A.M., F.S. El-Ferally, and W.S. Li., Antimicrobial activity of phenolic constituents of *Magnolia grandiflora* L., *J. Pharmaceutical Sciences* 70: 951-952 (1981)
43. 신김, 목본식물로부터 추출된 항균물질의 구조 및 특성, 박사학위논문, 산림자원학과, 고려대학교 (1998)
44. 서화중, 마늘, 양파, 고추즙의 항균작용, *한국식품영양과학회지*, 28(1), 94-99 (1999)
45. 이신호, 임용숙, 오미자의 병원성 미생물에 대한 항균효과, *한국식품영양과학회지*, 27(2), 239-243 (1998)
46. 전영옥, 김건희, 김순임, 한영실, 질경이 추출물의 항균성 검색, *한국조리과학회지.*, 14(5) 498-502 (1998)
47. 강성구, 성낙계, 김용두, 신수철, 서재신, 최갑성, 박석규, 갓 추출물의 항균활성 검색, *한국영양식량학회지*, 23(6), 1008-1013 (1994)
48. 서기림, 김도엽, 양성일, 고추냉이 추출물의 항균효과에 관한 연구, *한국영양학회지*, 28(11), 1073-1077 (1995)
49. 신동화, 김문숙, 한지숙, 국내산 약용식물 추출물에 대한 항균성 검색과 농도별 및 분획별 항균특성, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 29(4),

808-816 (1997)

50. 남상해, 양민석, 한국 추출물의 항균력, 한국농화학회지, 38(3), 269-272 (1995)
51. 박수현, 백두옹 추출물의 항균활성에 관한 연구, 박사학위논문, 의학과, 고려대학교 (2001)
52. 양민석, 하영래, 남상해, 최상욱, 장대식, 국내 자생식물의 항균활성, 한국농화학회지, 38(6), 584-589 (1995)
53. Randolph T. Major, the Ginkgo, the most ancient living tree. Science 157:1270-1273 (1967)
54. 한국의 자원식물 I, 김태정, 서울대학교 출판부(1998)
55. 남상진, 김길웅, 신동현, 황선주, 은행잎에 함유된 생리활성물질의 동정, Kor. J. Weed Sei., 17(4), 421-430 (1997)
56. G.Mazzanti, MT.Mascellino, L.Battineli, D.Coluccia, M.Manganaro, L.Saso, Antimicrobial investigation of semipurified fractions of *Ginkgo biloba* leaves, Journal of Ethnopharmacology, 71, 83-88 (2000)
57. 강류선, 염정록, 강삼식, 은행잎 중 Flavonol Glycoside 성분의 계절별 함량 변화에 관한 연구, Kor. J. Pharmacoh., 24(1), 47-53 (1993)
58. Braquet, p., Ginkgolides: Chemistry, biology, pharmacology and clinical perspectives, p.794., J. r. Prous Science Publishers, Barcelona (1998)
59. van Beek, T. A. and G. P. Lelyveld, concentration of Ginkgolides and Bilobalide in *Ginkgo biloba* leaves in relation to the time of year., Planta Med., 58:413-416 (1992)
60. Adawadkar, P.D., EL Sohly, M.a., Isolation, purification and antimicrobial activity of anacardic acids from *Ginkgo biloba* fruits. Fitoterapia, 52, 129-135 (1981)
61. Itokawa, H., Totsuka, N., Antitumor principles from *Ginkgo biloba* L.,

- Chem. Pharm. Bull., 35(7), 3016-3020 (1987)
62. Major, R.t., The ginkgo, the most ancient living tree. The resistance of *Ginkgo biloba* L. to pests accounts in part for the longevity of this species., *Science*, 157, 1270-1273 (1967)
  63. Mourey, M., Mortier, F., Mourey, A., Activity antimicrobienne d'extraits de feuilles de *Ginkgo biloba* L., *Plantes medicinales et phytotherapie.*, Tome X I X 4, 270-276 (1985)
  64. Atzori, C., Bruno, a., Chichino, G., Bombardilli, E., Scaglia, M., Ghione, M., Activity of bilobalide, a sesterterpene form *Ginkgo biloba*, on *Pneumocystis carinii*. *Antimicrob., Agents Chemother.*, 37, 1492-1496 (1993)
  65. Ahn, Y. J., M. kwon, H. M. Park and c. K. Han, Potent insecticidal activity of *Ginkgo biloba* derived trilactone terpenes against *Nilaparvata lugens.*, pp. 90-105. In *Phytochemicals for Pest Control*. ACS Symp. Ser. No. 658, Am. Chem. Soc., Washington, DC (1997)
  66. Xu Huang, Wei-jun Xie, Zhen-zhen Gong, characteristics and antifungal activity of a chitin binding protein from *Ginkgo biloba*, *REBS Letters*, 478, 123-126 (2000)
  67. 정종평, 구영, 배기환, 후박 및 은행잎 추출물의 항균, 항염 및 세포활성도에 미치는 영향, 대한 치주과학회지, 25(3) (1995) 양은영, 홍수명, 안용준, 권오경, 은행잎 유래 살충성분 bilobalide와 그 분해물의 살충활성, 한국농약과학회지, 제 5권 제 1호 (2001)
  68. 池川 信夫, 丸茂 晋本 一, 星 元紀, 生理活性物質のバイオアッヤイ, 講談社, 17-29 (1984)
  69. Amsterdam, D. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media, 52-111. 50. (1996)

70. Klindworth, K.J., Davidson, D.M., Breke, C.J., Brekke, A.L. and Branen, A.L., Inhibition of *Clostridium perfringens* by Butylated Hydroxy Anisole. *J. Food Sci.* 44(2), 564 (1979)
71. R. Julkunen-Titto, *J. Agric. Food Chem.*, 33(2), 213 (1985)
72. N. A., M. Eskin, H. Ernst, and F.Chaim, *Agric. Food Chem.*, 26(4), 973 (1978)
73. 박희경, 김경립, 신혜원, 계승희, 유화춘, 급식장의 조리기구·용기 및 작업환경에 대한 미생물학적 위해 분석, *한국식품위생안전성학회지*, 15(4), 317 (2000)
74. 강성구, *한국영양식량학회지*, 24(5), 695-701 (1995)
75. 홍남주, 노영두, 김남재, 김진식, 추백피의 약효연구, *생약회지*, 21:217 (1990)
76. 정창호, 허재연, 심기환, 밤나무 잎의 화학성분, 항산화 및 항균활성, *한국식품저장유통학회지*, 9(2), 234-238 (2002)
77. Chitwood LA, Tube dilution antimicrobial susceptibility testing : Efficacy of a microtechnique applicable to diagnostic laboratories, *Appl. Microbiol.* 17, 707 (1969)
78. Jones RN, Barry AL, Bigelow J, Gavan TL and Thornsberry C, Evaluation of the MICUR system for quantitative antimicrobial susceptibility testing : A multi phasic comparison with reference methods, *J. Clin., Microbiol.*, 16, 153 (1982)
79. Barry AL and Badal RE, Reliability of the microdilution technique for detection of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*, *Am. J. Clin. Pathol.* 67, 489 (1977)
80. Boyce JM, Lytle LS and Walsh DA, Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by microdilution and disk elution susceptibility

- systems, J. Clin. Microbiol., 20, 1068 (1984)
81. Sutter VL, Emerman J, Randall E, Zabrandky RJ and Birk RJ, Establishment of MICs of moxalactam for control and reference anaerobic organisms in agar dilution and microdilution technique, Antimicrob. Agents Chemother., 27, 42 (1985)
  82. Gavan TL, Jones RN and Barry AL, Evaluation of the sensititre system for quantitative antimicrobial drug susceptibility testing, A collaborative study, Antimicrob. Agents Chemother., 17, 464 (1980)
  83. Tabak M., Armom R., Potasman I. and Neeman I., In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* by extracts of thyme., J. Appl. Bacteriol., 80, 667-672 (1996)
  84. 이정준, 김성훈, 장병식, 이중복, 허철성, 김태종, 백영진, 약용식물 추출물의 *Helicobacter pylori*에 대한 항균활성, Korean J. Food Sci. Technol., 31(3), 764-770 (1999)
  85. 최석철, 정진순, 봉선화 추출물의 항균성에 관한 연구(I), Journal of the Korean Fiber Society, 34(6) (1997)
  86. ACS Symposium Series 507, Phenolic compounds in Food and Their Effects on Health II, 160-161, American Chemical Society, Washington DC (1992)
  87. 한성순, 충북대학교 논문집, 22, 481 (1981)
  88. J. B. Harborne, The Flavonoids Part 2, 1011~1042, A Subsidiary of Harcourt Brace Jovanovich Publishers, N.Y. (1975)
  89. L. Farkas, Flavonoids and Bioflavonoids, 287-302, Elsevier Science Publishers, Amsterda, (1985)
  90. 吉積 智司, 食品工業, 28 (1977)
  91. S. A. Vekiari *et al.*, JAOSS, 70(5) (1993)

92. 한성순, 이종길, 김영소, 충북대학교 논문집, 28, 443 (1984)
93. 한성순, 이종길, 유일준, 충북대학교 논문집, 30, 341 (1985)
94. 한성순, 안순희, 한국균학회지, 16(1), 33 (1988)
95. 한성순, 안순희, 충북대학교 약학논문집, 4, 44 (1989)
96. 한성순, 이종길, 김영숙, 약학회지, 36, 5, 407 (1992)
97. 이경순, 이승호, 충북대학교 논문집, 25, 355 (1983)
98. 이경순, 노재섭, 이경호, 이승호, 충북대학교 논문집, 30, 333 (1985)

# **Abstract**

## **Anitmicrobial Activities of the Extract of *Gingko biloba* L. leaves on the food-borne pathogens**

**Sung, Ki-Ok**

**Department of Food and Nutrition**

**Graduate school**

**Sungshin Women's University**

The substances from the methanol extract of leaves of *Gingko biloba* L, the plant grows naturally in Korea, have been fractionated by four solvents according to polarities in order to investigate antimicrobial compounds in nature. Antimicrobial effects against four microorganisms (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes*) were measured by paper disc method. Furthermore, minimum inhibitory concentrations (MIC) growth inhibition curve, 24 hour - inhibitory effect rate, phenol compound contents, and heat & pH safety analyses have been

performed. Synergistic effect was identified by adding extract of kitchen detergent sold at a market. In order to purify antimicrobial substances from the butanol fraction, which exhibited a strong antimicrobial activity, silica gel column chromatography, thin layer chromatography(TLC) were applied. The following results were obtained

1. The yield ratio of methanol of *Gingko biloba* L. leaves extract was 24.35%. The yield ratios of Water, chloroform, and butanol fractions were 40.19%, 18.21%, and 16.05% respectively. However n-hexane fraction and ethylacetate fraction were taken in the ratio of less than 10.00%.

2. Using paper disc method, the methanol extract showed an antimicrobial effect against all test microorganisms(7.5mm). Ethylacetate fraction, butanol fraction, and water fraction showed a strong antimicrobial effect against *E. coli*(9mm) and *S. typhimurium*(8mm).

3. MICs of microorganisms obtained by broth micro-dilution method were 62.5 $\mu$ g/ml for *E. coli*, *S. typhimurium*, and *L. monocytogens* and 31.15 $\mu$ g/ml for *S. aureus*. The lowest value indicated that the substance could exhibit antimicrobial activity at the low level concentration.

4. Inhibitions for all species grown in the medium with various fractions of *Gingko biloba* L. leaves extract increased proportionally to the concentration of extract solutions. In addition, the antimicrobial effects lasted for at least 48 hours for all species.

5. The results of identifying antimicrobial inhibitory effect rates showed that methanol extract had more than 20%, especially 60% of inhibitory effect against *S. aureus*. Butanol fraction was obtained, and high inhibitory effect rates of more than 50% against *E. coli*, *S. typhimurium* and *L. monocytogenes*. Ethylacetate had an inhibitory effect rate more than 20% against all

microorganism and water fraction had more than 20% except *S. aureus*. n-Hexane fraction had 74% against *E. coli* and more than 100% against *S. aureus*. Chloroform fraction had 88% against *S. aureus*.

6. At the result of phenol compound contents of *Gingko biloba* L., butanol fraction was more than twice as much as methanol extract. Moreover, the value for ethylacetate was similar to that of butanol fraction. According to water fraction, methanol extract, chloroform fraction and n-hexane fraction decreased the phenolic compound contents.

7. After heat treatment to the methanol extract and butanol fraction at 40, 80, 100, and 120° for an hour, growth rates of *S. typhimurium* were measured for each case. According to the result of growth rates, there was no difference in antimicrobial activity on all tests and controls. Especially, methanol extract treated with heat at 120° had antimicrobial activity, which means that methanol extract is a very stable substance with heat.

8. In result of growth of *S. aureus* in the medium adding the methanol extract treated with various pH conditions(2, 5, 7, 9, 11), there was no difference in antimicrobial activity. Therefore, its stability on pH was high quality. While butanol fraction was stable against acid, the more alkali side was the lower activity.

9. The number of survival microorganisms was counted as an antimicrobial effect against *S. aureus* for kitchen detergent, added with the methanol extract at various concentrations. Especially, antimicrobial effect against *E. coli* was superior to the others. The extract of 500 ppm, 1500ppm had 16.15%, 0.08% of microorganism of the detergent, respectively. Against *S. aureus*, the extract of 500 ppm, 1000ppm, and 1500ppm had 49%, 34%, and 0.12% of microorganism of the detergent, respectively. Against *S. typhimurium*, the extract of 500 ppm, 1000ppm, and 1500ppm had 83%, 58%, and 20% of microorganism of the detergent respectively. Against *L. monocytogenes*, the extract of 1500ppm

had 5.29% of microorganism of the detergent.

10. In order to isolate antimicrobial substance, the butanol fraction which exhibited a strong antimicrobial activity was purified by silica gel column chromatography. The antimicrobial effect for 4 microorganisms of the 49~60 subfractions among the obtained 118 fraction was increase against butanol fraction.

11. The 49~60 subfractions that increased antimicrobial effect by silica gel column chromatography isolated by TLC. The R<sub>f</sub> value of 0.38 was regarded the antimicrobial substances.

As results, *Gingko biloba* L. leaves contain antimicrobial activity components, and it showed the strongest antimicrobial effect upon the butanol fraction. Since it was stable with changing temperature and pH, it implied that it could be used for process property widely as a broad spectrum. Using normal detergents, it was confirmed that *Gingko biloba* L. leaves extract exhibit antimicrobial synergistic effect, and the results suggested that it is highly applicable to use as an antimicrobial material. In order to isolate and purify antimicrobial substances, solvent fractionation, silica gel column chromatography, TLC analysis techniques were applied. Also, *Gingko biloba* L. growing naturally in Korea is invaluable to develop as a natural antimicrobial material after isolation and identification.