한국환경과학회지 제15권(제10호), 983~988, 2006
Journal of the Environmental Sciences

박물관에서 분리된 세균에 대한 은행잎 추출물의 항균활성

권 영 숙* · 조 현 혹** · 정 성 윤*** · 이 상 엽 · 김 민 주 · 조 순 자 · 이 상 준
*부산대학교 전통복식연구소, **부산대학교 신소재섬유공학과,
***부산대학교 한국Bio-IT파운드리 부산센터, 부산대학교 미생물학과
(*2006*년 *8*월 *14*일 접수; *2006*년 *8*월 *30*일 채택)

Antibacterial Activities of *Ginkgo Biloba* Leaves Extracts Against Isolated Bacteria from Museums

Young-Suk Kwon*, Hyun-Hok Cho, Seong-Yun Jeong***, Sang-Youb Lee, Min-Ju Kim, Sun-Ja Cho and Sang-Joon Lee**

**Korean Traditional Costume Research Institute, Pusan National University, Busan 609-735, Korea*
***Department of Textile Engineering, Pusan National University, Busan 609-735, Korea*
****Korea Bio-IT Foundry Center, Pusan National University, Busan 609-735, Korea*
Department of Microbiology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea
(Manuscript received 14 August, 2006; accepted 30 August, 2006)

The textile remains have been affected largely by environmental factors including microorganisms because they were composed of organic compounds to be easy to damage. So, we selected 8 strains of the 131 isolated strains from museum environments and textile remains by high protease activity, and identified them for measuring the antibacterial activity of *Gingko biloba* extracts. They were identified Genus Arthrobacter spp. 3 strains (*Arthrobacter nicotiannae* A12, *Arthrobacter* sp B12, *Arthrobacter oxidans* B13), Genus Bacillus spp. 2 strains (*Bacillus licheniformis* D9, *Bacillus cereus* D33), Genus Pseudomonas spp. 2 strains (*Pseudomonas putida* A24, *Pseudomonas fluorescene* C21) and a Genus Staphylococcus sp. 1 strain (*Staphylococcus pasteuri* D3) as closest strains through the blast search of NCBI. Though antibacterial activity of the extracts of *Gingko biloba* leaves as MIC was lower than that of other pharmaceutical antibiotics. However the extracts was crude extracts, the extracts might have good antibacterial against most of the isolates from museum. Especially, the antifungal activity of *Gingko biloba* is known previously, the extracts of *Gingko biloba* leaves has possibility of usage as a good natural material for conservation of remains.

Key Words : Textile remains, Gingko biloba, Museum, Antibacterial ability, MIC

1. 서 론

섬유류 문화재는 그 재료의 특성상 자연환경에서 취화되기 쉬운 유기물로 구성되어 있어 환경조건에 민감하게 반응을 한다. 따라서 이들 문화재의 보존에는 광선, 수분감소에 따른 경화 등과 같은 물리적인 조건뿐만 아니라 생물학적 요인에 대해서도 적절한 제어대책이 필요하다.

본 연구에서는 생물학적 요인에 대한 대책마련을 위하여 우선적으로 다양한 박물관 환경에 서식하고 있는 세균을 분리하였다[1]. 그리고 이들 박물관 환경과 유물에서 분리된 세균 중 protease활성이 높은 균주들을 시험균주로 선별하였는데, 이들 균주들은 견과 모섬유와 같이 구성요소가 단백질로 된 유물에 있어 미생물에 의한 열화와 크게 연관성을 가질 것으로 예측할 수 있다. 그러므로 이러한 미생물을 제어할 수 있는 항균성을 갖는 천연

Corresponding Author : Sang-Joon Lee, Department of Microbiology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea
Phone: +82-51-510-2268
E-mail: sangjoon@pusan.ac.kr

물질[2~4]을 찾고자 하는 일환으로서, 이미 항진균성[5]에 대해서는 잘 알려져 있는 은행잎추출물을 선택하여 박물관에서 분리·선별된 균들에 대한 항균활성을 살펴보았다. 아울러 견과 모로 된 섬유류 유물의 보존에 있어 은행잎 추출물의 응용 가능성을 살펴보기 위하여, 동일한 분리균에 대해 기존 항생제가 가지는 항균활성을 disk법에 의해 살펴봄으로써 은행잎 추출물의 항균활성을 비교 평가하였다. 그리고 본 실험에 사용된 은행잎 추출물은 박물관 환경으로부터 분리된 균에 대한 천연 항균성 물질 검색의 초기 실험단계로서 다양한 물질들을 검색하는데 있어 효율성을 높이고자 하여 조추출물을 이용하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 항균활성실험을 위한 시험균주의 선별

박물관 환경으로부터 분리된 콜로니 성상이 다른 131개의 균주 중에서 은행잎 추출물과 항생제에 대한 항균활성의 측정을 위한 시험대상균으로 단백질분해활성이 높은 균주를 선택하였다. 단백질분해활성 균주의 선별방법은 분리된 모든 균주를 skim milk agar배지(1% casein peptone, 0.5% yeast extract, 0.5% sodium chloride, 1% skim milk, 1.5% agar)상에 도말하여 투명환의 폭이 큰 것을 기준으로 선정하였다. 대조균으로는 미국 직물협회에서 직물의 항균성 실험[6]의 표준균주로 사용되어지는 *Klebsiella pneumoniae, Stapylococcus aureus*를 KCTC (Korean Collection for Type Cultures)로부터 균주분양을 받아 비교실험하였다.

2.2. 분리균주의 동정

선별된 균주는 형태적 특성 및 Gram염색, oxidase, catalase 활성 실험과 같은 간단한 생화학적 특성과 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석한 결과를 바탕으로 NCBI (National Center for Biotechnology Information)를 통해 주로 동정하였다[7]. 16S rRNA 유전자의 염기서열분석을 위하여 유전자증폭시 사용한 primers의 염기서열은 forward primer (27F) 5′- AGAGTTTGATYMTGGCTCAG -3′와 reverse primer (1529R) 5′ - CAK(G/T)AA AGGAGGTGATCC -3′이다[8].

2.3. 은행잎 조추출물의 제법

은행잎 시료는 2006년 3월 국내 한약재상에서 구입하여 사용하였다. 구입된 은행잎은 50℃의 진공 oven에서 6시간 건조하여 분쇄기로 분쇄하였다. 분쇄된 은행잎은 40과 120 mesh (sieve opening: 425 - 125 μm)의 체에 걸러진 은행잎 분말 100 g을 85% ethanol (3 x 1L)과 dichloromethane (3 x 1L)으로 추출하였다. 85% ethanol 추출물을 40℃에서 진공건조방식으로 농축하였으며, 농축된 시료를 teflon stopper가 부착된 separatory funnel에 넣고 에틸아세테이트, 부탄올, 물 500 ml씩의 용매를 순서대로 넣어서 분획 추출하고 진공건조 방식으로 농축하여 실험에 사용할 조추출물 시료로 하였다(Fig. 1).

2.4. 은행잎 추출물의 항균활성 측정

96 well의 plate에 은행잎추출물이 서로 다른 농도가 되도록 단계적으로 희석하여 넣은 후, 일정량의 균주배양액을 첨가하여 배양한 후 흡광도를 측정함으로써 항균활성을 조사하는 비탁법 (broth microdilution method)이 사용되었다. 배지로는 실험균주 모두가 원활하게 잘 자라는 부이온배지 (10 g Bacto-Peptone or Thiotone, 5 g Beef extract, 5 g NaCl를 1 L의 증류수에 녹인 배지)를 사용하였다. 항균성 시험을 위한 은행잎 추출물의 설정농도는 각각 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6, 7.8, 3.9과 1.9 μg/mℓ이었다. 균주의 접종량은 각 well당 0.5 McFarland이었다. 이렇게 준비된 것을 30 ℃ 배양기에서 24시간 배양한 후, well내 균의 생육정도는 Microplate Reader(Benchmark, Bio-Rad사)에 의해 595 nm의 흡광도로 측정하였다. 은행잎추출물의 항균활성을 나타내는 최소저해농도(Minimum Inhibition Concentration: MIC)는 은행잎 추출물을 넣지 않고 추출용매만 넣은 대조군의 흡광도에 대비해 50%이하로 생육한 농도로 설정하여 결과를 도출하였으며, 동일한 실험을 2배수로 실시하여 그 결과를 얻었다.

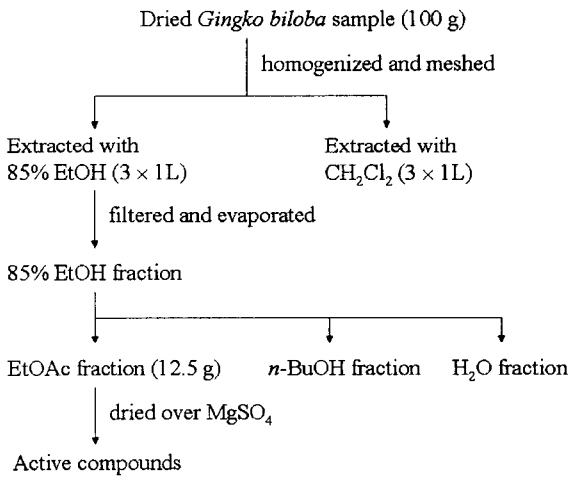

Fig. 1. Isolation of antibacterial compounds from *Gingko biloba* sample.

2.5. 항생제에 대한 항균활성의 측정

박물관에서 선별된 균주의 항생제에 대한 감수성을 측정하는 방법으로 disk 확산법을 사용하였다. 균주는 흡광도 0.5 McFarland로 전 배양한 후, Muller-Hinton 평판배지(300 g Beef of infusion form, 17.5 g Casamino acids, 1.5 g Starch, 17 g Bacto agar를 11.9 L의 증류수에 녹인 배지)에 적당량을 도말하였다[9]. 그 후 실온에 약 15분간 두어 표면을 건조시킨 후 멸균된 핀셋을 이용하여 항균물질이 흡수되어 있는 25종의 disk (BBLTm Sensi-DiscTm Antimicrobial Susceptility Test Disc)를 평판배지 위에 각각 두었다. 이 평판들을 30 ± 0.5℃의 항온배양기에 넣어 18 -20 시간 배양후 각각의 균들이 자라지 못한 생육저해환의 지름을 mm단위로 측정하여 결과를 산출하였다. 이때 이중환이 생긴 경우에는 그 평균값으로 결과를 도출하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 시험균주의 선별

은행잎 추출물의 항균성을 측정하기 위하여 박물관 환경과 섬유류 유물로부터 분리한 131개 분리균 중 단백질 분해능이 높은 8개 균주가 선별되었으며, 이들 분리균주의 형태적, 생화학적 특성은 Table 1과 같다.

Table 1. Characteristics of colony and biochemical reaction of the isolated strains

Strains	Colony Morphology	Gram stain	Catalase	Oxidase
A 12	round, smooth, opaque yellow,	+	+	+
A 24	round, creamy	-	+	+
B 12	round, creamy	+	+	+
B 13	viscosity, creamy	+	+	+
C 21	round, convex, creamy	-	+	+
D 3	tiny, round, convex,	+	+	+
D 9	irregular, hilly,	+	+	+
D 33	rhizoid	+	+	+

3.2. 선별된 균주의 동정

분리균주의 동정은 균주의 형태적 특성, Gram염색, oxidase와 catalase 활성시험과 같은 간단한 생화학적 특성(Table 1) 및 16S rRNA 유전자의 염기서열 분석 결과(Table 2)를 종합하여 동정하였다. 이상의 결과에서 선별된 8개의 분리균주는 Arthrobacter속 3종 (*Arthrobacter nicotiannae* A12, *Arthrobacter* sp B12, *Arthrobacter oxidans* B13), Bacillus속 2종 (*Bacillus licheniformis* D9, *Bacillus cereus* D33), Pseudomonas속 2종 (*Pseudomonas putida* A24, *Pseudomonas fluorescene* C21)과 Staphylococcus속 1종 (*Staphylococcus pasteuri* D3)으로 동정되었다. 이들 분리균주의 전반적인 특성을 살펴보면, Arthrobacter속은 방선균으로서 생육조건이 불리한 환경에서 다른 균을 배제시키고 자랄 수 있는 균들이 많으며, Pseudomonas속은 다른 미생물들의 생육이 불가능한 영양 조건 등의 열악한 환경조건에서도 자랄 수 있는 균이 많다는 것이 이미 널리 알려져 있다. 그리고 Bacillus속의 경우는 포자를 형성함으로써 불리한 조건에 내성을 가질 수 있는 균들이다. 이렇듯 박물관 유물 보존 환경은 일반 영양이 풍부한 곳에서만 잘 서식하는 미생물들이 생육하기에는 어려운 환경이므로, 선별된 대부분의 균들은 일반미생물이 자라기에는 열악한 환경에서도 생육하거나 내성을 가진 세균들임을 알 수 있었다.

3.3. 은행잎 추출물의 항균활성

은행잎 추출물의 항균활성은 Table 3에서 보는 바와 같다. Fig. 1에서의 부탄을 추출물과 물을 이용한 추출물에서의 항균성은 에틸아세테이트를 가지고 추출한 액에 비하여 낮은 항균성을 나타내어, 본 실험에서는 에틸아세테이트를 추출용매로 한 은행잎 추출물을 사용하였다. 결과에 의하면 은행잎 추출물은 *Staphylococcus aureus*과 *Bacillus*

Table 2. Identification of isolated strains from domestic museum environments by 16S rRNA gene sequences

Strains	NCBI Accesion no.	Homology (%)	Identification
A 12	AJ315492	1491/1498 (99.87)	*Arthrobacter nicotiannae*
A 24	DQ402053	1489/1499 (99.33)	*Pseudomonas putida*
B 12	AJ551172	1480/1487 (99.53)	*Arthrobacter sp.* An34
B 13	X83408	1473/1485 (99.19)	*Arthrobacter oxidans*
C 21	DQ402053	1478/1495 (98.86)	*Pseudomonas fluorescene*
D 3	AJ717376	1530/1534 (99.74)	*Staphylococcus pasteuri*
D 9	CP000002	1489/1503 (99.10)	*Bacillus licheniformis*
D 33	AB247137	1507/1510 (99.8)	*Bacillus cereus*

Table 3. Antibacterial activities of *Gingko biloba* leaves extracts (MIC:minimum inhibition concentration)

Strains	MIC (ug/ml)	Strains	MIC (ug/ml)
Arthrobacter nicotiannae A12	250~125	*Staphylococcus pasteuri* D3	250
Pseudomonas putida A24	125~62.5	*Bacillus licheniformis* D9	62.5
Arthrobacter sp. B12	125~62.5	*Bacillus cereus* D33	15.6
Arthrobacter oxidans B13	62.5~31.3	*Klebsiella pneumoniae**	not effective
Pseudomonas fluorescene C21	not effective	*Stapylococcus aureus**	8

* Control strains (AATCC Test Method 100-2004)

cereus D33에 대하여 MIC가 각각 7.8 ug/ml와 15.6 ug/ml으로 가장 높은 항균활성을 보여주었다. 다음으로 *Arthrobacter oxidans* B13에 대해서는 31.3 ~ 62.5 ug/ml, *Bacillus licheniformis* D9에 대해서는 62.5 ug/ml, *Arthrobacter* sp. B12와 *Pseudomonas putida* A24 에 대해서는 62.5 ~ 125 ug/ml, *Arthrobacter nicotiannae* A12 에 대해서는 125 ~ 250 ug/ml, *Staphylococcus pasteuri* D3에 대해서는 250 ug/ml의 순으로 항균활성을 보여주었다. 그러나 *Pseudomonas fluorescene*으로 동정된 분리균주 *Pseudomonas fluorescene* C21과, 본 실험의 표준대조균주인 *Klebsiella pneumoniae*은 은행잎 추출물 1,000 ug/ml 에서도 내성을 가지고 있어 전혀 생육에 저해를 받지 않았다.

3.4. 시험균의 항생제에 대한 감수성

은행잎 조추출물의 항균활성을 기존에 잘 알려진 항생제와의 활성비교를 위해 항생제 감수성시험을 디스크법에 의해 실시하였다. 본 시험에 사용된 25종의 항생제 가운데 8종의 분리균주 모두에 감수성을 가지는 항생제는 amikacin, amoxicillin/clavulanic acid, cefotaxime, cefotetan, chloramphenicol, ciprofloxacin, erythromycin, gentamicin, imipenem, kanamycin, rifampin, streptomycin, tetracyclin으로 모두 13종이었다. 특히 박물관에서 분리된 균주는 다른 항생제에 비하여 imipenem와 kanamycin에 대해 높은 감수성을 보여주었다 (Fig. 2, Table 4).

시판 항생제의 분리균주에 대한 감수성 실험결과에 의하면, gentamycin, streptomycin과 ticarcillin을 제외한 대부분의 항생제가 박물관 분리균주에 대하여 30 ug/ml이하의 농도에서도 생육을 억제시켰다. 한편, 은행잎 추출물의 경우 박물관 분리균주에 대한 MIC농도가 기존 항생제보다 다소 고농도 (15.6 ~ 250 ug/ml)로 나타났다. 이와 같은 실험결과는 본 실험에 사용되어진 은행잎 추출물이 정제되지 않은 crude한 추출물을 이용한 실험인 것을 감안한다면 비교적 항균활성이 우수함을 알 수 있었다. 향후 이러한 천연물질에서 유래된 항균성 물질은 실용화를 하고자 할 때 정제된 물질에 의한 정확한 MIC를 얻어 비교할 필요가 있을 것으로 사료된다.

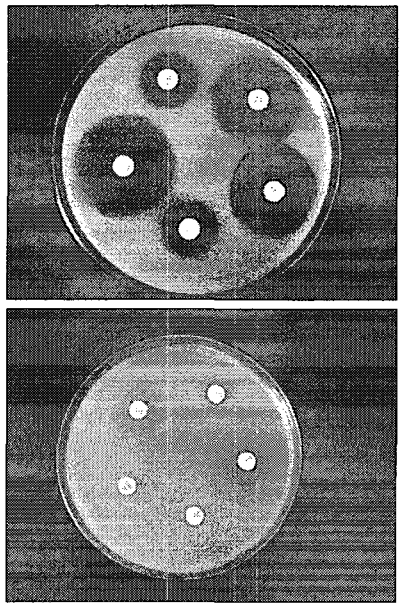

Fig. 2. Photographs of disk diffusion method.

한편, 은행잎 조추출물에 대해서 내성을 가지고 있는 균주였던 *Pseudomonas fluorescene* C21의 경우에는 본 실험에 사용된 약제성 항생제 25종류 중 ampicillin, ampicillin/sulbactam, cefazolin, cephalothin, clindamycin, oxacillin, penicillin, vancomycin 등 8종의 항생제에 대해서도 내성을 가지고 있어 두 실험 결과가 서로 일치함을 보여주었다.

특히, 현재까지 개발되어 시판되는 항생물질중에는 Gram 양성과 음성 모두에 효과가 있는 것도 있지만 대부분 Gram 양성과 음성에 따라 항생제의 효과가 다르게 나타나는 것이 대부분이다. 은행잎 추출물의 경우 시험균주 10종 중 7종의 Gram 양성균 모두에 있어 뛰어난 항균력을 가졌다. 그러나 시험균주 중 3종에 해당하는 Gram 음성균중에서는 2종에는 항균효과를 가지지 못했으며 *Pseudomonas*

Table 4. Antibacterial susceptabilities of isolated strains to 25 antibiotics discs (inhibition zone diameter: mm)

Antibiotics \ Strains	A 12	A 24	B 12	B 13	C 21	D 3	D 9	D 33
Amikacin 30*	30	28	30	30	30	25	20	14
Amoxicillin/Clavulanic Acid 20/10*	36	26	40	40	24	34	40	10
Ampicillin 10*	34	26	35	30	0	12	12	7
Ampicillin/Sulbactam 10/10*	36	28	34	38	0	24	24	8
Cefazolin 30*	28	34	28	30	0	7	32	30
Cefepime 30*	33	28	20	26	36	0	33	20
Cefotaxime 30*	37	25	33	28	20	31	33	8
Cefotetan 30*	32	30	10	13	20	18	24	18
Cephalothin 30*	40	30	34	34	0	38	40	7
Chlorampenicol 30*	7	30	38	40	10	24	23	13
Ciprofloxacin 5*	29	26	26	26	42	19	16	8
Clindamycin 2*	26	10	26	20	0	20	30	13
Erythromycin 15*	20	37	40	38	7	25	23	20
Gentamicin 120*	26	20	23	28	27	24	24	15
Imipenem 10*	44	36	40	42	36	45	44	35
Kanamycin 30*	28	23	26	28	28	26	22	19
Nalidixic Acid 30*	0	6	10	10	18	10	12	24
Oxacillin 1*	16	0	7	0	0	0	22	32
Penicillin 10*	40	28	36	34	0	14	14	0
Rifampin 5*	32	28	40	38	10	32	45	14
Streptomycin 300*	14	26	20	32	26	20	22	18
Tetracycline 30*	8	30	40	36	22	10	8	16
Ticarcillin 75*	38	26	40	35	9	19	19	0
Trimethoprim/Sulfamethaoxazole 1.25/23.75*	18	0	36	32	10	20	0	16
Vancomycin 30*	24	30	36	26	0	18	22	18

* The numbers mean concentration of antibiotics (ug/ml)
[1] *Arthrobacter nicotiannae* A12
[2] *Pseudomonas putida* A24
[3] *Arthrobacter sp.* B12
[4] *Arthrobacter oxidans* B13
[5] *Pseudomonas fluorescene* C21
[6] *Staphylococcus pasteuri* D3
[7] *Bacillus licheniformis* D9
[8] *Bacillus cereus* D33

putida A24에 대해서도 MIC로 125 ~ 62.5 ug/ml의 비교적 높은 MIC를 갖는 것으로 미루어 볼 때, 은행잎 추출물의 경우 Gram 음성균보다는 Gram 양성균에 대해 항균활성이 높은 것을 알 수 있었다.

4. 결 론

국내 박물관 환경과 섬유류 유물로부터 분리된 131개 균주 중에서 단백질 분해활성이 높은 8개의 균주를 선별하여 동정한 결과 Arthrobacter속 3종 (*Arthrobacter nicotiannae* A12, *Arthrobacter* sp B12, *Arthrobacter oxidans* B13), Bacillus속 2종 (*Bacillus licheniformis* D9, *Bacillus cereus* D33), Pseudomonas속 2종 (*Pseudomonas putida* A24, *Pseudomonas fluorescene* C21)과 Staphylococcus속 1종 (*Staphylococcus pasteuri* D3)이었다.

박물관 환경에서의 미생물에 의한 열화현상을 줄이는 방안으로서의 천연 항생물질을 검색하는 일환으로 선정된 은행잎 조추출물의 항균성에 관한 실험결과에 의하면, 은행잎을 에틸아세테이트를 추출용매로 한 조추출물은 사용된 표준균주 중 *Stapylococcus aureus* 1종과, 박물관 분리균주중에서는 *Pseudomonas fluorescene* C21을 제외한 나머지 7종의 세균에 대하여 항균활성을 가진다는 것을 알 수 있었다. 그중에서도 은행잎 조추출물은 Gram 양성균에 대해 비교적 높은 항균활성을 나타내었다. 따라서, 은행잎 성분의 경우에는 이미 항진균성도 보고된 바가 있어 견과 모를 주재료로 한 유물의 보존에 있어 세균뿐만 아니라 진균에 의한 침해도 제어할 수 있는 보존제로서의 응용가치를 가질 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 특정기초연구 (R01-2003-000-10276-0)의 지원으로 수행되었음.

참 고 문 헌

1) Lee, S. J., J. D. Lee, M. S. Cha, N. E. Lee, S. J. Yoon, H. H. Cho and Y. S. Kwon, 2005, Distribution of Microorganisms in Domestic Museum Environments, Kor. J. of the Environmental Sciences, 14(8), 1225-4517.
2) Kang, S. C. and Y. H. Moon, 1992, Isolation and Antimicrobial Activity of a Naphthoquinone from Impatiens balsamina, Kor. J. Pharmacogn, 23, 240-247.
3) Kwag J. S. and S. H. Baek, 2003, Cytoxicity and Antimicrobial Effects of Extracts from Salvia miltiorrhiza, Kor. J. Pharmacogn, 34, 293-296.
4) Park, Y. H., 2006, A Study on Functionality of the Fabrics Dyed with Pine Needles Extract, Journal of the Korean Society of Costume, 56, 147-154.
5) Wang, H. and T. B. Ng, 2000, Gingkgilobin, a Novel Antifungal Protein from Ginkgo biloba Seeds with Sequence Similarity to Embryo-Abundunt Protein, Biochemical and Biophysical Research Communication, 279:407-411.
6) AATCC, 2005, American Asssociation for Textile Chemists and Colorists Test Method 100-2004, Antibacterial Finishes on Textile Materials, AATCC, 149-151.
7) Benson, H. J., 1998, Microbiological Applications, Seventh Edition, McGraw-Hill, pp.151-163.
8) Lang, D. J., 1991, 16S/23S rRNA sequencing, In E. Stackebrandt and M. Goodfellow(ed.), Nucleic acid techniques in bacterial systematics, John Wiley and Sons, New York, pp.115-175.
9) Mencucci, R., U. Menchini and R. Dei, 2006, Antimicrobial Activity of Antibiotic-treated Amniotic Membrane: An In Vitro Study, Cornea, 25, 428-431.