프로폴리스의 구강구취균에 대한 항균성

김상아 · 정현정*
인하대학교 식품영양학과

Antimicrobial Effects of Propolis against Oral Microorganisms

Sang-A Kim and Hyun-Jung Chung*

Department of Food and Nutrition, Inha University

Abstract Propolis is a resinous mixture found in the tree buds, sap flows, and other botanical sources, which is used by honey bees in the construction of their hives. Antimicrobial effects of propolis were evaluated against *Streptococcus mutans* KCTC 3065, *S. sobrinus* KCTC 3308, *S. sobrinus* KCTC 5134, and *Porphyromonas gingivalis* KCTC 5352 by an agar diffusion assay. Sensitivity of these microorganisms to propolis was evaluated in broth containing different concentrations of propolis at 37°C, followed by observation using transmission electron microscopy (TEM). Propolis inhibited all oral microorganisms tested at the minimum inhibitory concentration (MIC) of 0.14 mg/μL in the agar diffusion assay. Treatment with 0.06 and 0.22 mg/μL of propolis had a bactericidal effect in a concentration- and treatment time-dependent manner against the tested microorganisms. TEM of propolis-treated *S. mutans* KCTC 3065 and *P. gingivalis* KCTC 5352 revealed structural damage of the cell membrane. The activity of propolis was affected by heat and pH treatment. The results indicate that propolis shows antibacterial activity against oral microorganisms and that it has potential for future applications in the food industry.

Keywords: antimicrobial effect, propolis, oral microorganisms, agar diffusion assay, transmission electron microscopy

서론

프로폴리스(propolis)는 우리나라에서 1995년 식품공전에 등재된 천연물질로 벌집에서 얻어지는 지용성 복합체이며, 식물이 꽃 봉오리와 생장점을 보호하기 위해 분비하는 왁스와 수지물질을 모아 벌 자신의 침샘 분비물과 혼합하여 만든 수지성, 점착성, 고무상의 물질이다. 꿀벌은 프로폴리스를 벌집 출입구에 발라 외부로부터 균의 유입을 막기 위해 사용하며, 주로 벌통 내의 표면 틈새에 발라 빗물과 냉기를 막았으며 벌집 전체 구조를 강화하기 위해 사용한다. 프로폴리스의 생산은 벌들에 의해 채집되기 때문에 채집 조건에 따라 다르며 프로폴리스의 조성 또한 산지에 따라 차이가 있으나, 일반적으로 수지 50-55%, 밀랍 30%, 정유 8-10%, 회분 5%, 각종 유기성분, 미네랄 등의 성분으로 이루어져 있으며, 구성성분은 약 150-180여 개의 휘발성 물질과 페놀계 화합물로 알려져 있다. 일반 성분 중에는 조지방이 가장 많이 함유되어 있으며 조지방이 가장 적게 함유되어 있다(1). 프로폴리스 내에는 각종 유기물과 플라보노이드가 다량 함유되어 있으며 성분 중 플라보노이드는 강력한 항균효과를 가지는 것으로 보고되고 있다(2). 프로폴리스는 물에 대한 용해도가 비교적 낮은 편이며, 전통적으로 항세균작용, 항곰팡이, 항바이러스활동으로

잘 알려져 있다(3). 주로 그람 양성균과 곰팡이에 크게 활성을 가지며, 프로폴리스의 플라보노이드가 항세균작용(antibacterial)에 크게 영향을 주며 항돌연변이 효과를 지니는 것으로 알려져 있다(4). Kim 등(5)은 프로폴리스 에탄올 추출물이 *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Bacillus cereus*의 성장을 억제하고 *Escherichia coli*와 *Pseudomonas aeruginosa*의 성장을 부분적으로 억제한다고 보고하였다. 또한 프로폴리스는 indoleamine-2,3-dioxygenase 활동을 저해 시켜 면역 기능과 항산화 능력을 갖는 것으로 알려져 있다(1, 6-8). 유지의 산화에 있어서도 palm oil과 lard에 단독으로 사용하거나 synergist로서 첨가하였을 때 프로폴리스가 항산화 상승 효과를 가진다고 보고되었다(9,10). 프로폴리스는 장내세균에 대해서 항균작용을 갖는 것이 아니므로 경구 투여하여도 비피더스균과 같은 장내 균주에는 악영향이 없어 독성이 없는 안전한 천연 항균성 물질로 알려져 있다.

구강은 외부와 직접 통하고 있어 균의 침입이 쉬우며 구강의 환경은 세균이 증식하는데 있어 적합하여 세균이 정착하기 쉬운 환경을 가지고 있다. 치주질환과 충치(dental caries, 치아우식증)는 구강의 주된 질환으로 *S. mutans*와 같은 세균에 의해 입 속의 음식물 찌꺼기가 부패되면서 만들어지는 산에 의해 치아의 석회성분이 녹거나 파괴되는 세균성 질환이다. *S. mutans*는 균체 표층이나 균체 외에 치아우식증의 원인이 되는 효소인 glucosyltransferase (GTF)를 가지며 자당(sucrose)으로부터 비수용성 글루칸(glucan)을 형성하게 되며, 비수용성 글루칸은 치아표면에 다른 세균과 함께 부착되어 치아 우식의 유발에 영향을 미치는 것으로 알려졌다. 또한, 구내염(stomatitis)의 경우 입안에 상처가 생기거나 저항력이 약해진 후 구강 내의 병원성 세균, 바이러스 등의 감염에 의해 나타난다(11). 치주질환은 *Porphyromonas gingivalis*,

*Corresponding author: Hyun-Jung Chung, Department of Food and Nutrition, Inha University, Incheon 402-751, Korea
Tel: 82-32-860-8122
Fax: 82-32-862-8120
E-mail: hjchung@inha.ac.kr
Received January 18, 2013; revised April 12, 2013;
accepted April 12, 2013

Prevotella intermedia 등 그람 음성 혐기성 세균 종으로 알려져 있으며 *S. mutans*는 치아 우식증의 주된 원인균이며 *P. gingivalis*는 성인형 치주질환의 원인균으로서 진행성, 회농성 치주염을 유발하는 것으로 보고되고 있다(12). 특히 *S. mutans*의 경우 우식 위험도를 측정하는 지표로서 사용되며, *Candida albicans*는 정상 구강 세균의 하나로 의치구내염과 구강염의 원인균이 된다. 치아 우식 부위에서 주로 *S. mutans*와 *S. sobrinus*가 발견되며 *P. gingivalis*는 치주 질환과 치근단 감염을 일으키는 세균 중 가장 독성이 강한 것으로 보고 된 바 있다(13).

구강 내 *S. mutans*, *P. gingivalis* 등의 구강구취균의 성장을 억제제를 통해 치주염과 같은 구강병의 예방 및 치료에 중요하게 여겨지고 있다. 구강 질환의 원인인 치면세균막 형성의 억제를 위한 구강위생용품에 대한 연구가 지속되고 있으며 그 동안 항생제, 불소함유제, 인산칼슘 등을 이용한 연구가 지속되어 왔다. 하지만 과도한 섭취 시 복통 유발과 반점치 등의 각각의 문제점이 있어 최근 인체에 안전하면서도 부작용 없이 작용하는 천연물을 이용한 구강 질환 억제에 대한 관심이 높아지고 있다. 치아우식증에 있어 항균제는 치면세균막의 감소와 생성을 억제 하는 등의 기능을 가지고 있다(14). 된장, 들깨 추출물, 차, 해조류 등의 천연식품에서 구강구취균에 대한 항균작용이 뛰어나다고 밝혀진 바 있으며, 프로폴리스의 caffeic acid phenethyl ester가 *S. mutans*의 성장을 억제하고 GTF활성을 억제하는 것으로 보고된 바 있다(15-19). 프로폴리스 계통 물질인 caffeic acid, cinnamic acid, methylester 등이 *S. mutans*에 대해 억제효과가 크다고 보고하였다(20). 이에 본 연구에서는 천연물질인 프로폴리스를 사용하여 구강구취균에 대한 항균능력을 알아보고, 구강구취균의 세포에 미치는 영향을 전자현미경을 통해 알아보고자 한다. 또한 프로폴리스를 열 처리하거나 pH를 조절함으로써 가공 조건에서의 안정성을 조사하고자 한다.

재료 및 방법

균주

본 실험에서 사용된 구강구취균은 *S. mutans* (KCTC 3065), *S. sobrinus* (KCTC 3308, KCTC 5134), *P. gingivalis* (KCTC 5352)를 사용하였으며 한국생명공학연구원 생명자원센터(Daejeon, Korea)에서 분양 받아 사용하였다. 균주는 stock culture 상태로 -80°C에서 저장 보관하였으며 실험에 사용하기 위해서 각각의 구강구취균은 tryptic soy broth (TSB, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 배지를 이용하였다. 균주는 37°C에서 18시간 배양을 2번 거쳐 activation 시킨 후 실험에 사용하였다.

프로폴리스

본 실험에서 사용된 프로폴리스는 Withealth Propolis Co. (Kyungnam, Korea)에서 제공받은 국산 프로폴리스로 실험에 사용되기 전까지는 냉장온도(4°C)에서 보관하였다.

Agar Diffusion Assay

Agar diffusion assay를 위해 TSB 100 mL에 bacto agar (Difco) 0.75 g을 넣어 121°C에서 30분 가열하여 멸균시켜 soft tryptic soy agar (TSA, Difco)를 만든 후, 45°C로 식힌다. TSB에 접종하여 37°C에서 18시간 배양한 각 구강구취균 현탁액 0.1 mL를 45°C의 soft TSA에 분주하여 10^5 CFU/mL가 되도록 만들었다. 프로폴리스는 2배 희석을 통해서 5단계의 농도(2.2, 1.1, 0.56, 0.28, 0.14 mg/μL)를 준비하였다. 각 균이 분주된 0.75% soft TSA에 멸

균시킨 유리 실린더를 올린 후 희석한 각 농도의 프로폴리스를 10 μL씩 주입하였다. 주입 한 후에는 희석액이 잘 스며들 수 있도록 실온에서 4시간 방치하였고 그 후 37°C에서 18시간 배양하였으며 모든 실험은 3번 반복하였다.

구강구취균의 프로폴리스에 대한 감수성 시험

Agar diffusion assay를 통해 4개의 구강구취균이 프로폴리스에 대한 균의 감수성을 확인한 후 18시간 배양한 *S. mutans* (KCTC 3065), *S. sobrinus* (KCTC 3308, KCTC 5134), *P. gingivalis* (KCTC 5352)를 균 배양액의 농도가 10^5 CFU/mL가 되도록 TSB에 희석하여 접종하였다. 희석된 균 배양액 900 μL에 각 농도가 다른 프로폴리스(0.22, 0.06, 0.01 mg/μL)을 100 μL씩 접종하여 처리 후 37°C에서 배양하였다. 대조 군으로는 멸균한 증류수를 100 μL 처리하여 사용하였다. 프로폴리스의 각 균에 대한 항균활성은 배양 후 생성되는 집락(colony)의 수를 통해 확인하였다. 균은 TSA에 도말하여 균의 생육을 확인하였다. 모든 실험은 3번 반복하였으며 평균값을 이용하였으며 실험 방법은 Kim과 Chung (21)을 참고하여 진행하였다.

Transmission electron microscopy

S. mutans KCTC 3065에 프로폴리스 0.56 mg/μL을 세시간 처리한 균을 실험 군으로, 처리하지 않은 균을 대조 군으로 잡고, *P. gingivalis* KCTC 5352는 프로폴리스 2.2 mg/μL을 세시간 처리한 균을 실험 군으로 정한 후 처리하지 않은 균을 대조 군으로 하여 transmission electron microscopy (TEM, LIBRA 120, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)를 통해서 프로폴리스의 구강구취균 세포에 대한 영향을 알아보았다.

TEM의 표본을 위해 8,000 rpm에서 3분간 원심분리 하였다. 원심분리 한 후 상등액을 따라낸 pellet을 세포의 단백질 고정을 위해 modified Karnovsky's fixative 2% paraformaldehyde와 2% glutaraldehyde가 함유된 0.05 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2)를 이용해서 실온에서 2시간 동안 세포를 고정하였다. 이후 0.05 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2)를 10분 동안 실온에서 보관하여 씻어내는 과정을 세 번 반복하였다. 지방의 고정을 위해 2% osmium tetroxide가 함유된 0.05 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2)를 사용하여 2시간 동안 실온에서 보관하여 세포를 다시 고정하였다. 고정 후 증류수로 2번 세척한 후 세포의 1차 염색을 위해 0.5% uranyl acetate를 이용하여 4°C에서 하룻밤(18시간) 보관하였다. 이후 10분 간격으로 실온에서 에탄올 30, 50, 70, 80, 90, 100, 100%를 이용하여 탈수과정을 가졌다. 100% propylene oxide를 15분 간격으로 2번 반복하여 transition과정을 가졌다. Propylene oxide와 Spurr's resin을 1:1, 0:1, 0:1 비율로 맞춘 후 각각 2시간, 12시간, 2시간 동안 shaker (Sunkay, Japan)를 이용하여 반응시켰다.

반응 후 새로운 resin으로 교체한 표본은 70°C에서 24시간 동안 건조(polymerization) 한 후 TEM을 이용하여 관찰하였다.

프로폴리스의 열과 pH 안정성

프로폴리스의 열 안정성을 조사하기 위하여 프로폴리스 0.56 mg/μL을 각각 40, 60, 80 그리고 100°C에서 10분 동안 가열처리 하였다. TSB 100 mL에 bacto agar (Difco) 0.75 g을 넣어 121°C에서 30분 가열하여 멸균시켜 만든 soft TSA에 TSB에서 37°C에서 18시간 배양한 각 구강구취 균 현탁액 0.1 mL를 soft TSA에 분주하여 10^5 CFU/mL가 되도록 만들었다. 열처리된 시료는 열처리 한 후 멸균된 실린더를 soft TSA에 올린 후 각각의 시료를

10 µL씩 주입한 후 실온에서 4시간 흡수 시킨 후 37°C에서 18시간 배양하였으며 모든 실험은 3번 반복하였다.

프로폴리스의 pH 변화에 따른 구강구취균에 대한 항균력을 조사하기 위해 10⁵ CFU/mL로 조절하여 만든 soft TSA에 pH를 각 4, 6, 8 그리고 10으로 조정한 프로폴리스 0.56 mg/µL을 각각 10 µL씩 분주하여 실온에서 4시간 흡수 시킨 후 37°C에서 18시간 배양하였으며 모든 실험은 3번 반복하였다.

결과 및 고찰

프로폴리스의 구강구취균에 대한 항균활성

프로폴리스의 구강구취균에 대한 항균력은 agar diffusion assay를 이용하여 Table 1에 나타내었다. 배양 후 프로폴리스 처리에 따라 유리 실린더 주변에 나타나는 inhibition zone의 반경을 통해 프로폴리스의 항균력을 살펴보았다. *S. mutans*와 *S. sobrinus* 그리고 *P. gingivalis*에 대해 프로폴리스가 항균력을 갖는 것을 확인할 수 있었다. 특히 *S. sobrinus* KCTC 5134에 대한 항균력이 가장 뚜렷했으며 *S. mutans* KCTC 3065, *S. sobrinus* KCTC 3308에서도 프로폴리스가 항균성을 나타냄을 볼 수 있었으나 *P. gingivalis* KCTC 5352의 경우 실린더 주변에 zone이 뚜렷하게 나타나지 않고 실린더의 프로폴리스를 접촉 부위만 항균작용이 나타남을 미루어보아 *P. gingivalis*가 프로폴리스에 대해 저항성이 큰 것으로 나타났다. *S. sobrinus* KCTC 3308에 대한 프로폴리스의 항균력을 Fig. 1에 나타내었다. 점중환 프로폴리스의 농도가 진할수록 나타나는 zone의 직경이 넓은 것으로 보아 구강구취균

에 대한 프로폴리스의 항균력이 농도 의존적임을 추측해볼 수 있었다. 최소저해농도(minimum inhibitory concentration, MIC)는 균에 대한 저해가 나타나는 가장 최소의 농도로 프로폴리스 처리 후 유리 실린더 주변에 나타나는 zone 형성 정도로 판단하였다. 실험 결과 *S. sobrinus* KCTC 5134에 대한 프로폴리스의 최소저해농도는 0.14 mg/µL이며 *S. mutans* KCTC 3065, *S. sobrinus* KCTC 3308, *P. gingivalis* KCTC 5352에 대한 최소저해농도는 0.28 mg/µL이었다. *S. mutans*에 대한 프로폴리스의 최소저해농도, 0.14 mg/µL은 Kim 등(22)이 발표한 *S. mutans*에 대한 프로폴리스 추출물의 최소저해농도가 0.13-1 mg/mL 인것과 비교하였을 때 훨씬 높은 농도이며, 이는 항균물질 추출법과 항균활성 측정법 등의 차이에 의한 것으로 사료된다.

Amoros 등(23), Bonvehí 등(24)은 프로폴리스의 생체능력이 구강 미생물의 성장과 GTFs의 활동을 억제한다고 발표하였다. 또한, 플라보노이드 등의 화합물에서 *S. mutans*에 대한 GTFs의 검사를 통해 플라본 및 플라보놀은 GTF 활동을 저해하는데 크게 효과가 있다고 보고했다.

구강구취균의 프로폴리스에 대한 감수성 시험

4종의 구강구취균에 배양액에 대한 프로폴리스의 항균 효과를 살펴본 결과 *S. mutans* KCTC 3065를 제외한 실험 균들은 프로폴리스 0.22 mg/µL의 농도에서 6시간 이내에 99.9% 이상이 사멸하는 모습을 볼 수 있었다. 또한 프로폴리스의 농도가 높아질수록 짧은 시간에 급격한 균의 사멸을 나타냄을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

S. sobrinus KCTC 3308의 프로폴리스에 대한 항균효과는 Fig. 2(A)와 같다. 0.22 mg/µL의 프로폴리스를 첨가한 *S. sobrinus* KCTC 3308의 경우 짧은 시간 내에 균이 완전 사멸하는 것을 볼 수 있었다. 짧은 시간 내에 균이 사멸하는 것은 균이 프로폴리스에 민감하게 작용함을 의미하며 이는 agar diffusion assay에서 *S. sobrinus* KCTC 3308의 항균성이 가장 민감하게 나타났던 것과 일치한다. *S. sobrinus* KCTC 3308은 낮은 농도의 프로폴리스(0.01 mg/µL)에 의해서도 억제되었다.

S. mutans KCTC 3065, *S. sobrinus* KCTC 5134, *P. gingivalis* KCTC 5352에 대한 프로폴리스의 항균력은 Fig. 2에 나타내었다. *S. mutans* KCTC 3065는 0.22, 0.06 mg/µL 농도의 프로폴리스 처리 균의 경우 균의 감소에 대한 시간적 차이가 있었으며 균의 감소에 대한 항균 능력은 비슷하였으나 균의 완전한 사멸의 결과는 얻지 못하였다. 0.01 mg/µL의 프로폴리스 처리를 하였을 때 역시 약간의 균의 정균 작용을 볼 수 있었다. *S. sobrinus* KCTC 5134는 225 mg/µL 프로폴리스 처리에도 0.22 mg/µL의 프로폴리스 처리균과 비슷하게 초기 사멸 효과가 컸다. *P. gingivalis* KCTC 5352는 agar diffusion assay에서 보았듯 다른 구강구취균에 비해 프로폴리스에 대한 저항력이 강한 편이었다. 비교적 0.22 mg/µL 농도의 프로폴리스 처리균은 사멸속도는 느리나 처리 4시간 이후엔 비교적 큰 살균효과를 보였으나 0.06, 0.01 mg/µL 농도의 프로폴리스 처리 균의 경우 정균 효과를 보였다.

Kim과 Chung (21)은 *B. cereus*와 *B. cereus*의 포자를 상대로 각기 다른 농도의 프로폴리스를 이용하여 감수성을 실험한 결과, 프로폴리스의 농도가 크면 클수록 짧은 시간안에 균이 활성을 잃는 것을 확인하였으며 프로폴리스가 균에 대해 살균효과를 갖는다고 보고하였다. 또한 포자의 경우에는 유의적인 차이는 없었으나 *B. cereus* 포자에 대해 프로폴리스가 균의 성장을 억제하는 것을 확인하였으며 농도가 커질수록 그 효과도 크다고 보고하였다.

구강구취균의 경우 항균제에 있어 농도의존적인 성향을 보이

Table 1. Antimicrobial activity of propolis on various oral microorganisms

Microorganisms	Propolis concentration (mg/µL)				
	2.22	1.11	0.56	0.28	0.14
<i>S. mutans</i> KCTC 3065	++	+	+	+	-
<i>S. sobrinus</i> KCTC 5134	+++	+++	+++	++	+
<i>S. sobrinus</i> KCTC 3308	+++	+++	++	+	-
<i>P. gingivalis</i> KCTC 5352	+	+	+	+	-

- no inhibition; + little inhibition; ++ moderate inhibition; +++ good inhibition

Fig. 1. Zone of inhibition of propolis against *Streptococcus sobrinus* KCTC 3308.

Fig. 2. Inhibition of oral microorganisms in TSB in the presence of propolis at 37°C. (◆) no propolis; (■) propolis 0.22 mg/μL; (▲) propolis 0.06 mg/μL; (X) propolis 0.01 mg/μL. (A) *Streptococcus sobrinus* KCTC 3308, (B) *Streptococcus mutans* KCTC 3065, (C) *Streptococcus sobrinus* KCTC 5134, (D) *Porphyromonas gingivalis* KCTC 5352.

는 것이 보고되었다. Yoo 등(20)은 프로폴리스 계통 물질인 caffeic acid, cinnamic acid methylester, cinnamic acid ethylester, chrysin, genistein, quercetin을 이용하여 *S. mutans*, *Lactobacilli*, *Actionomyces*에 대한 억제 정도를 조사하여, 항균제의 농도가 높아질수록 *S. mutans*에 대한 억제효과가 크다고 보고하였으며, 특히 *S. mutans*에 대해 cinnamic acid methylester와 cinnamic acid ethylester, caffeic acid의 억제효과가 크다고 보고하였다. Song 등(25) 역시 caffeic acid phenethyl ester를 추출하여 *S. mutans*에 대한 성장과 GTFs 활성화에 대해 보고하였다. 시험관 희석법을 사용하였으며, 농도에 따라 caffeic acid phenethyl ester가 정균작용과 살균작용을 가지며 글루칸을 생성하는 GTFs 모두 농도 의존적으로 그 활성이 감소한다고 보고하였다. 또한 프로폴리스가 이와 같이 다양한 생리활성을 갖는 주된 이유로 cinnamic acid와 caffeic acids ester와 같은 플라보노이드에 의한 것으로 여겨지고 있다(25).

프로폴리스의 구강구취균에 대한 항균성 전자현미경 관찰

프로폴리스의 구강구취균 세포에 대한 영향을 알아보기 위하여, 프로폴리스를 처리한 *P. gingivalis* KCTC 5352와 *S. mutans* KCTC 3065를 TEM을 통하여 관찰하였으며 결과는 각각 Fig. 3과 Fig. 4와 같다. 프로폴리스 농도는 sensitive test 결과를 토대로 하여 *P. gingivalis* KCTC 5352는 2.2 mg/μL, *S. mutans* KCTC 3065는 0.56 mg/μL의 농도로 처리하였다.

TEM 사진 상에서 세포의 모형이 원형, 타원형으로 나타나는 것은 TEM 검사를 위한 박편 과정에서 세포를 얇게 절단하면서 생긴 모양인 것으로 추측해 볼 수 있었다. Fig. 3a는 프로폴리스를 처리하지 않은 *P. gingivalis* KCTC 5352으로 세포가 단단한

세포벽으로 감싸져 있는 것과 분열하는 것을 볼 수 있다. Fig. 3b의 사진은 프로폴리스 2.2 mg/μL을 세시간 처리 한 후 세포의 변화를 나타낸 사진으로서 세포벽이 얇아지고 붕괴되면서 세포를 채우고 있던 물질들이 빠져나가는 것을 볼 수 있다. Sensitive test를 통해 *P. gingivalis* KCTC 5352를 2.2 mg/μL에 세시간 처리 하였을 때 완전 사멸이 일어나지 않음을 확인하였으며 TEM사진에서 역시 붕괴되지 않은 세포들을 볼 수 있다. 이와 유사하게 Kim 등(26)은 *P. gingivalis*에 피톤치드를 첨가하여 배양하여 투과전자현미경하에서 관찰하였는데, 피톤치드를 첨가하지 않은 *P. gingivalis*는 뚜렷한 내막과 외막이 발견되며 세포질 내 밀도가 높았으며 피톤치드를 첨가하였을 때 세포질 내용물이 사라진 모습을 보고하였다. 또한 농도가 증가함에 따라 내막과 외막 두개의 막만 존재하는 세포의 수가 증가하는 것을 발견하였다. 본 실험에서 프로폴리스를 첨가하여 배양한 후의 *P. gingivalis*의 경우 세포질 내용물 뿐만 아니라 내, 외막의 붕괴까지 관찰할 수 있었다.

Fig. 4(a)는 프로폴리스를 첨가하지 않은 *S. mutans* KCTC 3065로, 세포질을 두꺼운 세포벽이 감싸고 있는 모습을 볼 수 있다. 반면 0.56 mg/μL의 프로폴리스를 처리한 *S. mutans* KCTC 3065의 경우 세포벽의 얇아지고 붕괴되면서 *P. gingivalis* (Fig. 3b)와 마찬가지로 세포 내의 물질이 빠져 나오는 것을 볼 수 있다. 또한, 붕괴의 정도가 더 크고 중간 TEM 사진의 경우 세포의 형태를 알아볼 수 없을 만큼 그 경계가 흐려져 있음을 확인 할 수 있었다. TEM 사진을 종합한 결과 프로폴리스를 처리 할 경우 세포벽의 경계가 흐려지고 붕괴되면서 세포 내부의 물질들이 밖으로 유실되고 세포가 붕괴되는 작용으로 프로폴리스가 *S. mutans*와 *P. gingivalis*에 대해 항균작용을 나타내는 것으로 사료된다.

Fig. 3. Transmission electron photomicrograph of untreated (a) and propolis treated (b) *Porphyromonas gingivalis* KCTC 5352.

Fig. 4. Transmission electron photomicrograph of untreated (a) and propolis treated (b) *Streptococcus mutans* KCTC 3065.

프로폴리스의 열과 pH 안정성

프로폴리스의 열과 pH에 대한 안정성을 시험하기 위하여, 열처리한 프로폴리스를 구강구취균에 대하여 agar diffusion assay를 하였다. 열처리 전에는 각각의 구강구취균에 대해 항균력을 보였던 0.56 mg/μL 농도의 프로폴리스를 실험에 사용하였으며 결과는 Table 2에 나타내었다. 열 처리한 후의 프로폴리스는 각 구강구취균에 대해 열처리 이전보다는 활성이 떨어지는 것으로 나타났다. 열 처리 이전의 프로폴리스는 *P. gingivalis* KCTC 5352에 가장 약한 활성을 가지고 *S. sobrinus* KCTC 5134에 가장 강한 활성을 보였으나 열 처리 후에는 *S. sobrinus* KCTC 5134에 대한 활성이 가장 약해졌음을 볼 수 있었으며 *S. mutans* KCTC 3065에 대해서는 항균활성을 보이지 않았다. 구강구취균들에 대해서는 40, 100°C에서 열처리한 프로폴리스에 대해서는 거의 대부분의 균이 활성을 보이지 않았으며 80°C에서 열처리 하였을 때

Table 2. Antimicrobial activity of heat treated propolis against oral microorganisms

Microorganisms	Treated temperature (°C)			
	40	60	80	100
<i>S. mutans</i> KCTC 3065	-	-	-	-
<i>S. sobrinus</i> KCTC 5134	-	+	-	-
<i>S. sobrinus</i> KCTC 3308	-	+	+	-
<i>P. gingivalis</i> KCTC 5352	+	-	+	-

- no inhibition; + little inhibition; ++ moderate inhibition; +++ good inhibition

Table 3. Antimicrobial activity of pH controlled propolis against oral microorganisms

Microorganisms	pH adjusted propolis			
	pH 4	pH 6	pH 8	pH 10
<i>S. mutans</i> KCTC 3065	-	+	+	-
<i>S. sobrinus</i> KCTC 5134	-	+	+	-
<i>S. sobrinus</i> KCTC 3308	-	+	-	-
<i>P. gingivalis</i> KCTC 5352	-	+	-	-

- no inhibition; + little inhibition; ++ moderate inhibition; +++ good inhibition

가장 활성이 두드러지게 나타남을 볼 수 있었다. 하지만 그 활성 역시 매우 약하였다. 프로폴리스의 pH에 대한 효과는 Table 3에 나타내었다. 프로폴리스의 활성이 pH 조절 전에 비해 줄어들음을 확인하였으며 특히 약산성인 pH 6에서의 프로폴리스가 비교적 가장 항균력이 있었으며, pH가 높아질수록 프로폴리스의 항균력이 감소하는 것으로 나타났다.

Chung 등(27)은 멸균 생리 식염수에 50%(w/v) 마늘 착즙액과 100°C에서 30분간 열처리한 마늘 착즙액을 그람 음성균 5종과 그람 양성균 10종의 식중독균과 젖산균에 접종하여 항균력 조사를 하였다. 생마늘의 경우 식중독균과 젖산균의 생육에 대해 강하게 항균력을 나타내었으나 열처리를 한 마늘의 경우 생마늘의 항균력과 비교하였을 때 비교적 약한 항균력을 보였다. Park 등(28)은 돌산장 추출물을 열처리하여 agar diffusion assay를 이용하여 돌산장 추출물이 4가지 균에 생육억제환의 크기가 비슷하였으며 열에 매우 안정하다는 결과를 보고하였으며, 오미자의 에탄올 추출물도 60-120°C에서 10°C 간격으로 1시간 씩 처리한 결과 오미자 추출물의 색의 변화는 나타났으나 항균력의 변화는 열처리 전과 비슷하여 열에 매우 안정하다고 보고하였다(29). Yoon 등(30)은 모자반 에탄올 추출물의 열 및 pH 안정성을 보고하였다. 식품의 부패 및 식중독 관련된 균주 16종에 대한 항균활성을 조사한 결과, 에탄올 추출물의 항균활성을 보고하였으며, 또한 모자반 에탄올 추출물은 121°C에서 15분간의 열처리와 pH 2-10 범위에서 안정하다고 보고하였다.

요 약

구강구취균 4종을 국내산 프로폴리스를 이용하여 프로폴리스의 농도, 열처리, pH의 변화를 통한 항균효과를 조사하였다. *P. gingivalis* KCTC 5352가 다소 프로폴리스에 저항적인 모습을 보였으나 그 외의 구강구취균에는 강한 항균활성을 나타내었다. 액체배지를 이용하여 프로폴리스의 농도를 조절하여 구강구취균의 민감도를 조사한 결과, 프로폴리스의 농도가 진할 수록 더 빠른

시간에 큰 활성을 보였으며 일반적으로 0.22 mg/μL 농도의 프로폴리스를 첨가하였을 경우 4-6시간 안에 대부분의 균이 사멸하였다. TEM을 통해 프로폴리스가 균의 세포에 어떤 영향을 미치는가 살펴보았으며 프로폴리스를 첨가한 균의 세포막이 얇아지면서 붕괴되고 안의 내부물질이 유출되면서 세포가 분해됨을 확인하였다. 0.56 mg/μL 농도의 프로폴리스를 사용하여 열처리 후와 pH 조절 후의 프로폴리스의 항균활성을 시험한 결과 열에 안정하지 않고, pH가 높아질수록 활성이 약해지는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 한식세계화용역연구사업의 한식 우수성·기능성 연구 연구비 지원에 의해 수행 되었으며 이에 감사드립니다.

References

- Jeong CH, Shin CS, Bae YI, Shim KH. Antioxidant activities of ethanol and water extracts from propolis. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 39: 1725-1730 (2010)
- Salomão K, Dantas AP, Borba CM, Campos LC, Machado DG, Aquino Neto FR, de Castro SL. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. *Lett. Appl. Microbiol.* 38: 87-92 (2004)
- Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J. Ethnopharmacol.* 64: 235-240 (1999)
- Jang IW, Park JS, Kwon HC, Jung MY, Choi DS. Antimutagenic and antibacterial activities of Korean and American propolis. *Korean J. Food Sci. Technol.* 41: 694-699 (2009)
- Kim HJ, Hwangbo S, Lee SW. Studies on the antioxidant effect of Korean propolis. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 22: 77-80 (2002)
- Lee HJ, Bae YI, Jeong CH, Shim KH. Biological activities of various solvent extracts from propolis. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34: 1-7 (2005)
- Gozde G, Baydar T, Ledochowski M, Schennach H, Bolukbasi DN, Sorkun K, Salih B, Sahin G, Fuchs D. Immunomodulatory effects of Turkish propolis: Changes in neopterin release and tryptophan degradation. *Immunobiol.* 214: 129-134 (2009)
- Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol.* 2000 5: 78-111 (1994)
- Park JH, Kum KY, Lee JH, Yu JY, Lee SJ. The inhibitory effect of taurine and alendronate on the osteoclast differentiation mediated by sonicated extracts of *Porphyromonas gingivalis* in vitro. *J. Korean Acad. Cons. Dent.* 26: 285-295 (2001)
- Lee SL, Kim JG. Inhibitory effects of Doen-jang (Korean fermented soybean paste) and soybean extracts on the growth of KB cells. *Kor. J. Env. Hlth.* 31: 444-450 (2005)
- Jo MJ, Min KJ. Antimicrobial activities against oral microbes and growth-inhibitory effect on oral tumor cell of extracts of perilla and mugwort. *Kor. J. Env. Hlth.* 33: 115-122 (2007)
- Yeo SG, Ahn CW, Kim IS, Park YB, Park YH, Kim SB. Antimicrobial effect of tea extracts from green tea, oolong tea and black tea. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 24: 293-298 (1995)
- Lee SL, Kim JG. Antimicrobial activity of Korean fermented soybean paste (Doen-jang) against oral microbes. *J. Env. Hlth. Sci.* 34: 207-212 (2008)
- Lim DK, Choi U, Shin DH, Jeong YS. Antioxidative effect of propolis extract on palm oil and lard. *Korean J. Food Sci. Technol.* 26: 622-626 (1994)
- Han SK. Antioxidative effect of different kinds of propolis on the oxidation of edible oils. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 23: 168-171 (2003)
- Cho JS, Kim YH, Kwon MS. Antibacterial effects of propolis extracts on microorganismic bacteria. *J. East Asian Soc. Dietary Life* 15: 457-464 (2005)
- Gibbons RJ, Houte JV. Bacterial adherence in oral microbial ecology. *Annu. Rev. Microbiol.* 29: 19-44 (1975)
- Song YH, Seo YS, Kim DS, Jung SR, Chang KW. Inhibitory effect of acid phenethyl ester on the growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus mutans*. *J. Korean. Acad. Dent. Health* 25: 299-306 (2001)
- Gebara ECE, Lima LA, Mayer MPA. Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. *Braz. J. Microbiol.* 33: 365-369 (2002)
- Yoo YK, RO JS, Kim JS, Chang KW. The antibacterial effects of some propolis constituents against *S. mutans*, *Lactobacilli* and *Actinomyces*. *J. Korean. Acad. Dent. Health* 20: 65-74 (1996)
- Kim YH, Chung HJ. The effects of Korean propolis against food-borne pathogens and transmission electron microscopic examination. *New Biotechnol.* 28: 713-718 (2011)
- Kim DB, Ju H, Baik BJ, Song WY, Song YH. Effects of propolis to the cariogenic activity of *Streptococcus mutans*. *J. Korean Acad. Pediatr. Dent.* 22: 231-238 (1995)
- Amoros M, Simões CM, Girre L, Sauvager F, Cormier M. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *J. Nat. Prod.* 55: 1732-1740 (1992)
- Bonvehi JS, Coll FV, Jordà RE. The composition active compounds and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71: 529-538 (1994)
- Song YH, Kim DS, Jung SR, Seo YS, Chang KW. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus mutans*. *J. Korean Acad. Dent. Health* 25: 299-306 (2001)
- Kim SQ, Shin MK, Auh QS, Lee JY, Hong JP, Chun YH. Effect of phytoncide on *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Medicine* 32: 137-150 (2007)
- Chung KS, Kim JY, Kim YM. Comparison of antibacterial activities of garlic juice and heat-treated garlic juice. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35: 540-543 (2003)
- Park SK, Park JR, Lee SW, Seo KI, Kang SK, Shim KH. Antimicrobial activity and heat stability of water-pretreated extract of leaf mustard dolsan (*Brassica juncea*). *J. Korean Soc. Food Nutr.* 24: 707-712 (1995)
- Chung KH, Lee SH, Lee YC, Kim JT. Antimicrobial activity of omija (*Schizandra chinensis*) extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 30: 127-132 (2001)
- Yoon SY, Lee SY, Kim KBWR, Song EJ, Lee SJ, Lee CJ, Park NB, Jung JY, Kwak JH, Nam KW, Ahn DH. Antimicrobial activity of the *Sargassum fulvellum* ethanol extract and the effect of temperature and pH on their activity. *Korean J. Food Sci. Technol.* 42: 155-159 (2010)