연구속보

아까시나무와 밤나무 유래 propolis의 휘발성 향기 성분 특성

송 효 남, 김 영 언, 이 영 철
특용작물이용팀

밀원식물을 달리하여 채집된 두 종류의 국내산 propolis의 향기성분을 Aroma Scan과 GC/MS로 분석하였다. Aroma Scan으로 아까시나무와 밤나무 유래의 두 propolis는 서로 다른 향기를 지닌것을 확인하였다. GC/MS로 분석한 propolis의 향기 성분은 아까시나무 유래 propolis의 44종과 밤나무 유래 propolis의 47종을 포함한 총 55종이 검출되었다. Aldehydes 5종, alcohols 8종, ketones 5종, esters 3종, fatty acid 1종을 비롯하여 27종의 hydrocarbons과 2종의 terpenes 및 4종의 phenolic derivatives가 검출되었다. Benzaldehyde, cinnamyl alcohol, eudesmol 및 benzyl benzoate 등을 포함한 36종의 화합물은 두시료에서 공통적으로 검출되었고, geraniol과 *n*-undecane을 포함한 8종의 성분은 아까시나무 유래의 propolis에서만 확인되었으며, piperitenone과 valencene을 포함한 11종의 화합물은 밤나무 유래의 propolis에서만 검출되어 밀원 식물에 따라 향기성분에 차이가 있는 것으로 나타났다.

Ⅰ. 서 론

기원전 3000 년경부터 오늘날에 이르기까지 인간은 꿀벌들로부터 벌꿀, royall jelly, 화분(pollen), 밀랍 및 봉침 등 여러 가지 봉산물을 얻어왔다. 이 중 propolis(봉교 또는 Bee glue)는 국내에서는 건강에 대한 관심의 증가와 함께 최근에야 많은 사람들의 주목을 받고 있다.

Propolis란 대부분의 식물들이 자신의 잎, 꽃, 열매 및 새싹 등을 보호하기 위해 분비하는 항균성과 방수성, 절연성을 가진 수지성의 화합물을 꿀벌들이 채취하여 그들의 타액의 효소와 혼합하여 만든 황갈색 또는 암갈색의 수지상 물질로 여러 가지 약리학적 효과와 생리활성을 지닌 것으로 알려져 있다. Propolis의 어원은 그리스어에서 유래된 것으로 "Pro"는 "방어시에, 방어를 위해서", "polis"는 "도시"란 의미를 가져 "도시앞에 있으면서 도시를 지킨다"는 뜻으로 결국 벌집을 지키는 물질이란

뜻이 된다[1, 2]. 꿀벌들은 propolis를 주로 벌통 내 표면의 틈새에 발라 냉기나 빗물의 유입을 방지하고 외부의 병원성 미생물로부터의 방어뿐 아니라 벌집 전체의 구조를 강화하며 꿀의 방부에도 관여하는 작용을 한다[3, 4]. 벌통안에서 밀랍과 함께 벌집을 짓는데 쓰기 위해 수집하기도 하지만 가장 중요한 용도는 여왕벌이 산란하기 전에 미리 벌방(소방)에다 propolis를 코팅하여 소독함으로써 알과 유충을 미생물로부터 안전하게 보호하는 역할을 하는데 있다[2].

Propolis는 독특한 향기를 지니고 있고 이는 propolis의 정유성분에 의한 것으로 알려져 있으며[5], 수집된 밀원식물의 수종에 따라서도 향의 차이가 있다. 그러나, propolis의 구성성분의 동정과 생리학적 기능에 관해 축적된 많은 연구결과에 비해 휘발성 성분에 대한 관심과 연구는 매우 미진한 편이며 영국산 propolis의 향기성분으로 benzyl alcohol을 비롯한 29종[6]과 11종의 방향족 화합물을 동정한 보고[7]와 propolis의 steam-volatile fraction의 향기성분을 분석한 결과[8] 및 동시증류추출법(Simultaneous Distillation and Extraction;SDE)으로 쿠바산 propolis에서 naphtoquinones과 sesquiterpenes을 동정한 결과[9]등이 보고되어 있다.

Aroma Scan은 시료의 휘발성 향기성분을 32개의 폴리머 센서(polymer sensor)에 대한 전기적 저항(electrical resistance)의 변화로 감지하여 향기 성분의 강도와 패턴을 인식하는 전자코이다. 최근들어 식품의 방향 성분에 대한 전자코의 응용은 활발히 연구되어 신선유(fresh oil)와 산패유(rancid oil)의 품질 구분[10], 맥주의 품질변화측정[11], 서로 다른 패턴을 지닌 농축된 화합물의 냄새구별[12] 및 품질등급에 따른 밀의 분류[13, 14]등 전자코에 의한 패턴 인식법은 그 응용 가능성이 매우 광범위해지고 있다.

본 연구에서는 밀원식물을 달리하여 채집한 아까시나무와 밤나무 유래 propolis의 향기성분을 Aroma Scan으로 비교하고, 동시증류추출법으로 포집하여 GC/MS로 휘발성 화합물을 확인하였다.

1.1 재료 및 방법

1.1.1 실험재료

경상북도 상주지역과 강원도 원주지역의 봉군에서 채집된 2종의 propolis를 천연의 상태로 구입하여 4℃의 암실에서 저장하면서 실험의 재료로 사용하였다. 1996년에 채집한 상주지역의 propolis는 아까시나무(falseacacia; 학명 *Robinia pseudoacacia* L.) 숲의 봉군에서, 1997년에 채집한 원주지역의 propolis는 밤나무(chestnut tree; 학명 *Castanea crenata*) 숲의 봉군에서 수집하였다.

1.1.2 Aroma Scan 에 의한 향기 패턴 분석

분말화한 propolis의 향기성분을 Tomlinson 등[11]과 Anna 등[15]의 방법에 따라 전자코가 32개 장착된 Aroma Scan(Model no. 32-12-008, Aroma Scan Co., England)을 이용하여 다음과 같이 분석하였다. 내부에 장착된 펌프가 외부 공기를 먼저 센서위로 150 *ml*/min의 유속으로 40 초간 흘려보낸 뒤, 시료병의 headspace의 공기를 120 초간 같은 유속으로 센서에 흘려보낸후 100 초간 세척공기가 유입되도록 3-방향 밸브를 조절하였다. 이때 유입되는 공기의 습도가 센서에 미치는 영향을 최소화 하기 위하여 실리카겔을 넣은 유리관을 사용하여 시료의 수분함량과 외부공기의 습도를 조절하였다.

예비실험을 통하여 전자코의 센서가 가장 민감하게 반응하는 3 g의 propolis를 루프가 연결된 500 *ml* 시료병에 넣고 밀봉하여 50℃의 항온기에서 30분간 평형에 도달시킨 propolis 시료의 headspace를 120 초간 센서를 통과시킬 때 발생하는 전기저항의 변화를 각각 5 반복씩 측정한 후 반응이 안정한 부분에 대해 센서의 반응을 표준화한 패턴과 냄새강도의 평균값으로부터 2차원 지도를 얻었다.

1.1.3 SDE에 의해 포집한 향기성분의 GC/MSD 분석

Propolis의 향기성분은 Tanchotikul와 Hsieh[16]의 방법에 따라 동시증류 추출법에 사용되는 Likens-Nickerson 장치(J&W Scientific Co., U.S.A.)를 이용하여 다음과 같이 포집하였다. 분말화한 propolis를 100 ㎖의 round flask에 5 g씩 취하고 50 ㎖의 증류수를 가하여 Likens-Nickerson 장치에 연결하고 *n*-pentane/diethyl ether(2:1, v/v)의 혼합용매 50 ㎖로 1시간 동안 향기 성분을 추출하였다. 수분을 제거하기 위해 추출액에 sodium sulfate(anhydrous)를 과량 가하여 밀봉한 후 냉장 온도에서 24 시간 방치하였다. 상등액을 분리하여 질소기류하에 농축하고 gas chromatography(Hewlett Packard 5890 II plus, U.S.A.)로 분석하였다. 농축시료 0.6 ㎕를 Simplicity-1(0.32 mm×30 m, 0.25 ㎛ thickness, Supelco Co., U.S.A.) column에 주입하여 60℃에서 4 분간 유지한 후 250℃까지 4℃/min의 속도로 상승시킨후 250℃에서 20분간 유지시켰고 FID로 검출하였다. 이 때 injector와 detector의 온도는 각각 250℃와 260℃였고, He을 carrier gas로 사용하였다. Gas chromatogram을 확인한 후 개별 향기성분 peak의 동정을 위해서 GC/MSD(HP 5973 MSD)를 이용하였고, mass spectrum은 Wiley's library로 확인하였다.

1.2 결과 및 고찰

1.2.1 Aroma Scan에 의한 향기 패턴

Propolis의 밀원 식물에 따른 향기의 차이를 분별하기 위하여 전자코에 의한 향기패턴 분석을 실시하여 두 propolis의 향기에 대한 32개 센서의 시간에 따른 반응 profile을 그림 1에 나타내었다. Y축은 각 센서에서의 저항의 변화%이며 측정결과 매우 빠른 시간내에 센서가 포화상태에 이르렀다. 이를 토대로 비교적 안정한 상태를 이룬 90~130초 사이의 profile을 표준화하고 각 향기성분에 대한 Aroma Scan의 기계적인 지문분석(fingerprint analysis)후 그림 2와 같은 2차원 그래프를 그렸다. Shiers와 Farnell[10]과 Tomlinson 등[11]은 그림 1과 같이 총저항의 변화에 대한 각 센서의 저항의 변화 비율을 얻은 후 주요 성분 분석(Principal Component Analysis; PCA)을 하면, 그림 2와 같은 2차원 그래프나 다차원 지도로 자료를 해석할 수 있다고 하였다. 이는 그래프상의 거리와 방향의 근접성에 따라 시료의 향기의 차이를 판단하는 것으로 같은 방향과 가까운 거리에 있는 점들은 서로 유사한 향기를 가지고 있고, 반대로 서로 다른 방향과 멀리 떨어져 있는 점들은 유사성이 없는 향기로 나타나는 것이다. 아까시나무 유래 propolis와 밤나무 유래 propolis는 그림 2에서와 같이 동일한 그룹끼리는 서로 같은 평면에 가까운 거리에 밀집해 있는 한편, 두 시료끼리는 서로 다른 방향과 먼 거리에 위치함으로써 서로 다른 패턴의 향기를 가진 시료의 그룹으로 분류할 수 있었다. Aishima[17]도 전자코 분석을 통하여 정유와 휘발성 향기성분 및 커피향을 구분함에 있어 향기성분의 화학적 구조에 따라 분류하는 것이 가능함을 보여준 바 있다.

이상과 같이 아까시나무와 밤나무 유래 propolis는 Aroma Scan에서의 패턴이 서로 다르게 나타나 향기성분의 차이가 있음을 알 수 있었다.

1.2.2 동시증류추출법에 의해 포집한 향기성분의 GC/MS 분석

Aroma Scan에 의해 서로 다른 패턴의 향기를 가진 것으로 나타난 두 propolis의 구체적인 개별 향기 성분을 GC/MS로 분석하여 얻은 total ion chromatogram과 확인된 개별 화합물을 그림 3과 표 1에 각각 나타내었다. 아까시나무 유래 propolis의 44종과 밤나무 유래 propolis의 47종을 포함한 총 55종의 향기성분이 검출되었다. Aldehydes 5종, alcohols 8종, ketones 5종, esters 3종, fatty acid 1종을 비롯하여 27종의

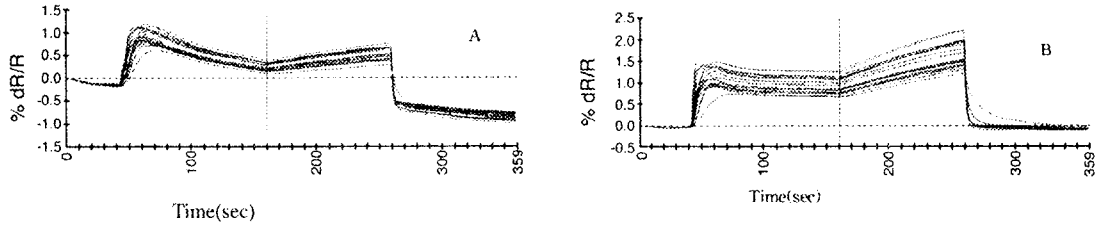

그림 1 Indivisual response of 32 sensors in Aroma Scan for the volatile flavor components of propolis A:falseacacia, B:chestnut tree

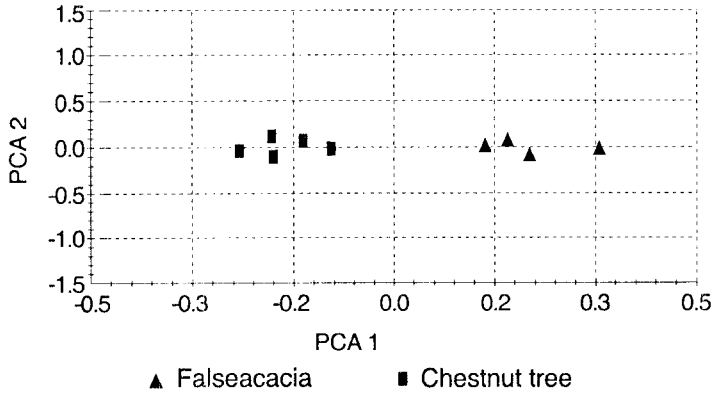

그림 2 Two dimensional map of relative response pattern for the volatile flavor components of propolis by Aroma Scan

hydrocarbons과 2종의 terpenes 및 4종의 phenolic derivatives가 검출되었다. Benzaldehyde, cinnamyl alcohol, eudesmol 및 benzyl benzoate 등을 포함한 36종의 화합물이 두 propolis에서 공통적으로 검출되었다. Greenway 등[6]은 영국의 두지역에서 채집한 propolis의 headspace volatiles을 포집하여 분석한 결과 benzaldehyde, benzyl alcohol 및 benzoic acid등을 포함한 29종의 향기성분을 동정하였으며, 두 지역의 propolis 모두 chromatogram의 초기에 용출된 휘발성 aldehyde, ketone, terpenes류가 풍부하였음을 보고하였다. 또한 Lemberkovics와 Petri[7]도 propolis에서 여러 가지의 방향족 화합물을 GC/MS로 동정한 결과 benzyl alcohol, guaiacol vinyl ether, benzyl acetate, cinnamyl alcohol 및 cinnamaldehyde를 비롯한 11종을 검출하였다고 보고하여 본 실험결과와 유사한 경향을 보였다. Janes와 Bumba[8]는 propolis의 steam-volatile fraction에서 benzoic acid, benzyl alcohol, sorbic acid, vanillin 및 eugenol 등을 확인하였으며, 기타 phenyl vinyl ether, anisyl vinyl ether 및 cyclohexybenzoate등의 화합물도 보고되어 있다[18].

한편, geraniol과 *n*-undecane을 포함한 8종의 성분은 아까시나무 유래의 propolis에서만 동정되었으며, piperitenone과 valencene을 포함한 11종의 화합물은 밤나무 유래의 propolis에서만 검출되어 차이를 보였다. Bracho[9]는 쿠바산 propolis의 대표적인 향기 성분으로 naphtoquinones과

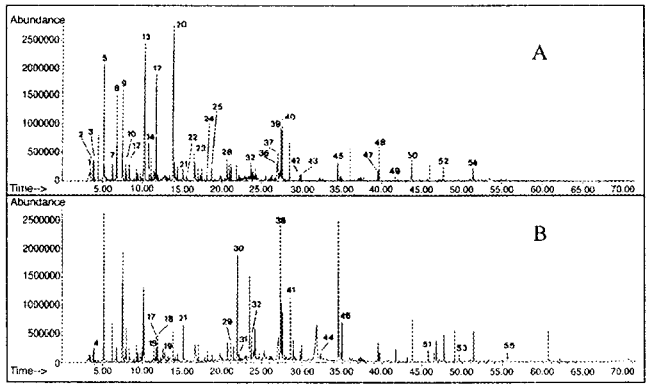

그림 3 Total ion chromatogram for the flavor compounds of propolis by GC/MS
A: falseacacia, B:chestnut tree

표 1. Flavor compounds identified in propolis by GC/MS

Peak no.	Retention time	Compounds	Area% Falseacacia	Area% chestnut tree
		Aldehydes		
5	5.136	benzaldehyde	5.41	6.01
8	6.770	*n*-octanal	4.83	0.57
13	10.297	nonanal	15.07	0.98
20	13.929	decyl aldehyde	14.13	1.14
21	15.130	cinnamaldehyde	0.51	1.46
		Alcohols		
9	7.514	benzyl alcohol	5.84	6.76
15	11.457	benzenemethanol	0.54	0.65
19	12.813	terpinene-4-ol	-	0.73
23	16.624	cinnamyl alcohol	0.92	0.91
37	27.083	γ-eudesmol	2.24	1.04
39	27.483	β-eudesmol	3.65	2.83
40	27.643	α-eudesmol	3.42	2.29
22	15.589	geraniol	0.36	-
		Ketones		
7	6.199	6-methyl-5-hepten-2-one	0.86	1.36
12	8.337	phenyl methyl ketone	0.69	0.43
24	18.139	acetocinnamone	0.43	0.42
30	21.927	geranyl acetone	-	5.43
41	28.604	piperitenone	-	2.94
		Esters		
18	11.926	benzyl acetate	0.27	0.97
43	29.975	benzyl benzoate	0.36	0.75
48	39.710	phenethyl cinnamate	1.96	0.49

Peak no.	Retention time	Compounds	Area% Falseacacia	Area% chestnut tree
		Fatty acid		
26	19.790	capric acid	0.59	-
		Terpenes		
6	5.199	α-pinene	0.49	-
11	7.982	limonene	0.35	1.18
		Phenolic derivatives		
4	3.845	vinyl-benzene	-	0.30
32	23.700	butylated hydroxytoluene	1.03	0.97
16	11.640	*p*-vinylanisole	0.44	0.23
25	18.750	4-vinyl-1,2-dimethoxybenzene	0.67	0.39
		Aliphatic hydorcarbons		
1	4.456	*n*-nonane	1.61	-
14	10.903	*n*-undecane	0.32	-
29	21.089	*n*-tetradecane	-	0.93
36	27.038	hexadecane	1.26	1.83
42	29.787	*n*-heptadecane	0.31	0.37
44	32.394	octadecane	-	0.29
45	34.885	*n*-nonadecane	0.29	7.39
47	39.532	*n*-heneicosane	0.52	0.83
49	41.715	*n*-docosane	0.24	0.61
50	43.812	*n*-tricosane	1.51	1.95
51	45.819	tetracosane	-	0.54
52	47.750	*n*-pentacosane	0.82	1.34
53	49.614	eicosane	-	0.33
54	51.420	*n*-heptacosane	0.77	1.38
55	55.604	onoacosane	-	0.65
31	22.152	α-humulene	0.34	0.33
33	23.934	γ-cadinene	0.55	0.51
35	24.254	δ-cadinene	0.68	0.66
10	7.902	1,8-cineole	0.87	-
46	35.006	1,3,6,10-cyclotetradecatetraene	-	1.87
		Monocyclic hydrocarbons		
2	3.514	*p*-xylene	1.10	0.21
3	3.827	cinnamene	0.75	-
		Polycyclic hydrocarbons		
17	11.750	cyclopropindene	5.51	0.96
28	20.666	β-caryophyllene	1.34	0.95
34	24.043	1s, cis-calamenene	0.29	0.43
38	27.337	valencene	-	6.88
27	19.922	α-copaene	0.24	-

sesquiterpenes을 동정하였는데 이들은 아까시나무와 밤나무 유래 propolis에서는 검출되지 않아 채집지역에 따라 propolis의 향기성분에 차이가 있는 것으로 생각된다.

두 propolis에서 27종이 함유되어 있는 것으로 나타난 hydrocarbones은 정유에서 흔히 발견되는 성분으로 Yang 등[19]은 5종의 감귤류의 정유로부터, 두 propolis에서도 확인된 limonene, δ-cadinene, α-pinene, δ-copaene 및 β-caryophyllene을 비롯한 총 29종의 hydrocarbones을 동정하였으며, 특히 α-pinene는 후추[20], 라임[21] 및 올레오레진[22]에서, β-caryophyllen은 계피[23]나 인도산 후추[24]에도 함유되어 있는 것으로 보고되어 있다. 일반적으로 propolis에 약 10%의 정유성분이 함유되어 있는 것[1]으로 볼 때 이와같은 hydrocarbones은 벌들이 propolis를 물어오는 과정에서 식물체의 정유성분이 혼입되어 온 것으로 추측된다. 한편, 두 propolis에서 검출된 cinnamaldehyde는 최근 Huang과 Ho[25]가 곡류저장중 생기는 곤충에 대해 훈증작용(fumigant acitivity)을 하고 식욕감퇴제의 역할을 하여 곡물을 보호해주는 성분인 것으로 보고한 점으로 미루어 propolis가 식물들이 자신을 보호하기 위해 분비하는 물질로부터 만들어진다는 사실과도 관련 있는 성분으로 추측된다.

이상과 같은 50℃에서의 headspace volatile을 비교한 Aroma Scan과 SDE로 추출한 향기성분의 GC/MS분석 결과로 미루어 밀원식물이 다른 propolis는 각각의 개별 향기성분에도 차이가 있는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Monti, M., Berti, E., Carminati, G., and Cusini, M. Occupational and cosmetic dermatitis from propolis. Contact Dermatitis 9: 163-164 (1983)
2. 임대관, 최웅, 신동화, 정용섭. Propolis 추출물의 유지 산화 억제 효과 비교, 한국식품과학회지 26(5) : 622-626 (1994)
3. 박호용, 오현우, 박두상, 장영덕. 한국산 봉교 추출물의 항생활성. 한국양봉학회지 10(1) : 53-56 (1995)
4. Hausen, B.M., Wollenweber, E., Senff, H., and Post, B. Propolis allergy. Contact Dermatitis 17 : 163-170 (1987)
5. Haydak, M.H. and Palmer, L.S. Royal jelly and beebread as sources of vitamin B_1, B_2, B_6, C, nicotinic acid and pantothenic acid. J. Econ. Ent. 35(3): 319 (1942)
6. Greenway, W., May, J., Scaysbrook, T., and Whatley, F.R. Identification by gas chromatography-mass spectrometry of 150 compounds in propolis. Z. Naturforsch, 46c: 111-121 (1991)
7. Lemberkovics, E. and Petri, G. Gas chromatographic characterization of frequently occurring aromatic compounds in essential oils. J. Chromatography 446: 267-274 (1988)
8. Janes, K. and Bumba, V. Propolis. Pharmazie. 29(8): 544-545 (1974)
9. Bracho, J.C. Comparison of isolation methods for propolis volatiles J. Essent. Oil Res. 8: 665-668 (1996)
10. Shiers, V.P. and Farnell, P.J. The electric nose: aroma profiling in the food industry. Food Technology International Europe. 168-171 (1995)
11. Tomlinson, J.B., Ormrod, I.H.L., and Sharpe, F.R. Electronic aroma detection in the brewery. J. Am. Soc. Brew. Chem. 53(4): 167-173 (1995)
12. Hobbs, P.J., Misselbrook, T.H., and Pain, B.F. Assessment of odours from

livestock wastes by a photoionization detector, an electronic nose, olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry. p.6. In: AFRC Institute of Grassland and Environmental Research, North Wyke, Okehampton, U.K. (1995)

13. Stetter, J.R., Findlay, M.W., Schroeder, K.M., Yue, C., and Penrose, W.R. Quality classification of grain using a sensor array and pattern recognition. Anal. Chim. Acta. 284: 1-11 (1993)
14. Borjesson, T., Eklov, T., Jonsson, A., Sundgren, H., and Schnurer, J. Electronic nose for odor classification of grains. Cereal Chemistry 73(4): 457-461 (1996)
15. Anna, M.P., Ahmad, A.Q., Paul, T., Stefan, S., and Krishna, C.P. Application of multiarray polymer sensors to food industries. Life Chemistry Reports 11: 303-308 (1994)
16. Tanchotikul, U. and Hsieh, T. C.-Y. Analysis of volatile flavor components in steamed rangia clam by dynamic headspace sampling and simultaneous distillation and extraction. J. Food Sci. 56(2): 327-331 (1991)
17. Aishima, T. Aroma discrimination by pattern recognition analysis of responses from semiconductor gas sensor array. J. Agric. Food Chem. 39: 752-756 (1991)
18. Ghisalberti, E.L. Propolis: A review. Bee World 60(2): 59-84 (1979)
19. Yang, R., Sugisawa, H., and Nakatani, H. Comparison of odor quality in peel oils of acid citrus. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi 39(1): 16-24 (1992)
20. Jirovetz, L., Buchbauer, G., and Ngassoum, M. Investigation of the essential oils from the dried fruits of Xylopia aethiopica(West African 'Peppertree') and Xylopia parviflora from Cmeroon. Ernaehrung 21(7/8): 324-325 (1997)
21. Dugo, P., Mondello, L., Lamonica, G., and Dugo, G. Characterization of cold-pressed key and Persian lime oils by gas chromatography, gas chromatography/mass spectroscopy, high-performance liquid chromatography, and physicochemical indices. J. Agri. Food Chem. 45(9): 3608-3616 (1997)
22. Mariotti, J.P., Tomi, F., Casanova, J., and Bernardini, A.F. Composition of the essential oil of Cistus ladaniferus L. cultivated in Corsica. Flavour Fragrance J. 12(3): 147-151 (1997)
23. Jayaprakasha, G.K., Jaganmohan, R.L., and Sakariah, K.K. Chemical composition of the volatile oil from the fruits of Cinnamonum zeylanicum Blume. Flavour Fragrance J. 12(5): 331-333 (1997)
24. Shankaracharya, N.N., Jaganmohan, R.L., Pura, N.J. and Nagalakshmi, S. Characterisation of chemical constituents of Indian long pepper(Piper longum L.). J. Food Sci. Tech. 34(1): 73-75 (1997)
25. Huang, Y. and Ho, S.H. Toxicity and antifeedant activities of cinnamaldehyde against the grain storage insects, Tribolium castaneum(Herbst) and Sitophilus zeamais Motsch. J. Stored Products Research 34(1): 11-17 (1998)