산업기술연구(강원대학교 산업기술연구소 논문집), 제27권 B호, 2007.
Journal of Industrial Technology, Kangwon Natl. Univ., Korea, No. 27 B, 2007.

프로폴리스 농도가 항균활성에 미치는 영향

The effect of propolis concentration on the antibacterial activity

김 병 문* 송 근 호** 이 광 래***
Kim, Byoung-Moon Song, Kun-Ho Lee, Kwang-rae

Abstract

The objetives of this study are to set up optimum extraction temperature, time and organic solvent for propolis extraction, to investigate chemical properties, and to develop health foods from propolis preparation. In this study, ethanol and ultrasonic extracts method performed to optimum extraction temperature was at 60, 20℃, optimum extraction time was at 12, 4 hours and optimum extraction amount of solvent was at 20, 15 times of propolis weight. When various ethanol solutions were used, whereas flavonoid content was highest in 70, 80% aqueous ethanol, respectively. So the ultrasonic extracts method used gave better results than the ethanol extracts method in this work.

Extraction of propolis with etanol and ultrasonic extracts method was performed by using the water and various concentrations of aqueous ethanol as solvent. Sensitivity of propolis samples to *Staphylococcus aureus* was investigated and the results were shown. Samples of water extract did not inhibit microbial growth, where as 50% aqueous ethanol extract the largest inhibitory zone for *Staphylococcus aureus*, then decreased inhibition with increasing ethanol concentrations.

키워드 : *프로폴리스, 플라보노이드, 추출, 항균활성, 초음파*
Keywords : *propolis, flavonoids, extraction, antibacterial activities, ultrasonic*

1. 서론

프로폴리스는 꿀벌이 식물의 꽃이나 잎, 수목의 생장점을 보호하기 위하여 분비되는 물질과 나뭇가지의 껍질 등이 벗겨져 상처 난 곳을 오염으로부터 예방하고 미생물로부터의 오염을 막기 위하여 분비하는 보호물질을 모아들인 것이다[1][2].

프로폴리스의 뜻은 그리스어인 pro(before)와 polis(city)의 합성어이며 꿀벌들이 벌집 입구에 프로폴리스를 이용하여 벽을 쌓는다는 의미에서 유래되었다[3].

꿀벌이 식물에서 분비되는 물질을 수집하고 이것을 꿀벌 타액의 효소와 혼합하여 육아봉의 큰 턱샘에서 만들어 낸 프로폴리스는 박테리아와 균류에 약효가 있는 천연항생물질이다. 꿀벌은 이것을 봉군보호를 위하여 벌통내부의 오염되기 쉬운 곳에 바르고 오염균류나 바이러스 및 외적을 방어하는데 활용한다. 특히, 여왕벌이 산란하기 전에 일벌이 미리 벌방에 프로폴리스를 엷게 발라서 알과 유충을 미생물로부터 안전하게 보호하며, 프로폴리스의 이와 같은 특성은 꿀벌이 채취한 식물체의 분비물 및 꿀벌의 타액에 미생물을 방어하는 물질이 있기 때문이다[2].

프로폴리스의 항균활성에 관한 연구로는

* 강원대학교 대학원 화학공학과 석사과정
** 강원대학교 화학공학과 박사후 과정, 공학박사
*** 강원대학교 화학공학과 교수, 공학박사

Bonvehi 등[6]이 15가지의 다른 수종에서 얻은 프로폴리스의 분석과 활성물질 및 식이에 대한 연구에서 프로폴리스의 성분은 Acacetin과 Apigenin이 대부분을 차지하고 Pinocembrin, Quercetin, Rutin, Vanillin 등이 적은 양으로 존재하며, *Bacillus subtillis*과 *Staphylococcus aureus*에 대하여 Tetracycline보다 53배, *Escherichia Coil*에 대하여는 400배 정도로 높은 항균효과가 있음을 보고하였다.

프로폴리스는 약 25% 이상이 왁스성분으로 구성되어 있고 탄소가 수십 개 이상인 밀집된 결합구조를 가지고 있다. 이 결합조직에 다량의 유효성분인 플라보노이드류가 함유되어 있어서 기존의 추출방법으로는 회수 및 농축의 어려운 단점을 가지고 있다. 기존의 프로폴리스의 추출방법[1]으로는 미셀화 추출법, 물 추출법, 초임계 추출법, 에탄올 추출법 등이 있다. 미셀화 추출법은 식용 글리세린을 이용하여 추출하는 방법으로 냄새가 좋고 마시기 쉽다는 장점이 있으나, 유효 성분의 용해가 에탄올에 비해 떨어지며 추출액이 딱딱해져 활용성 및 상품성이 떨어진다는 단점을 가지고 있다. 물 추출법은 냄새가 자극적이지 않고, 흡수율이 높은 장점을 갖은 반면, 지용성의 유효 성분이 용해되지 않아 그 효능이 많이 떨어진다는 단점이 있다. 그리고 초임계 추출법은 이산화탄소를 이용하여 초임계 상태를 만들어 유효 성분을 추출하는 것으로 착색, 산화부패의 염려가 없으며 향기 성분도 추출할 수 있는 장점이 있으나, 설비 및 생산비용이 높아 비경제적이다. 에탄올 추출법은 가장 보편적으로 사용되고 있으며 다른 방법에 비해 플라보노이드가 가장 많이 추출되는 방법으로 국제적으로 가장 널리 사용되는 방법이다. 하지만, 기존의 에탄올 추출법은 높은 온도에서 추출이 이루어지므로 플라보노이드의 화학적 변화와 회수율이 낮아 질 수 있고 왁스 성분의 추출량이 많아진다. 반면, 초음파를 병행하여 사용하면 낮은 온도에서 추출이 이루어지므로 에너지 소비가 적고 유용 성분의 파괴를 줄일 수 있으며, 밀랍 추출량이 적어 회수율을 높일 수 있게 된다. 천연물 추출에 초음파를 이용하는 것이 효과가 있다고 보고된 바 있다[8].

본 연구는 강원도 홍천지역의 프로폴리스 원괴를 에탄올 추출법과 초음파 추출법을 이용하여 추출 온도 및 시간, 용매의 총량, 용매의 비율을 변화시키면서 최적 추출 조건을 실험적으로 구하였고, 프로폴리스의 농도가 항균활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 Disk diffusion method와 OD(Optical Density)법을 이용하여 추출된 프로폴리스의 항균 성능을 실험하였다.

2. 이론적 배경

2.1 프로폴리스의 특성

프로폴리스는 여러 가지 화합물로 구성된 복합물질로서, 약 150여 가지 이상의 화합물로 구성되어 있으며 주요 구성성분은 Resins(45~55%), Waxes and fatty acids(25~35%), Essential oils(10%), Pollen(5%), Other organics and minerals(5%) 등으로 이루어져 있다[1].

프로폴리스는 온도에 따른 물리적 특성을 나타낸다. 15 ℃에서는 돌처럼 굳고 부서지기 쉬우며, 30 ℃에서는 부드럽고 유연해지며, 100 ℃이상에서는 용해되지만 정확한 융점은 62.5 ℃로 왁스의 융점이 66 ℃인 것에 비해 약간 낮으며 비중은 1.127이다[15].

프로폴리스의 화학성분의 중심은 플라보노이드이다. 플라보노이드는 식물계에 넓게 분포되어 있으며 대부분 배당체로서 존재하고 가수 분해되어 Aglycon의 형태로 존재하며 또한 알칼로이드의 존재도 확인되지 않는 특징이 있다. 기본골격의 산화단계의 차이에 따라 Flavones, Flavonones, Flavonols로도 분류된다(Fig. 1). 프로폴리스 중에는 Bio-Flavonoid를 약 124종을 함유하고 있으며, 이중 어떠한 성분은 항암 및 항바이러스 효과가 있는 것으로 알려져 있다[4],[5],[16].

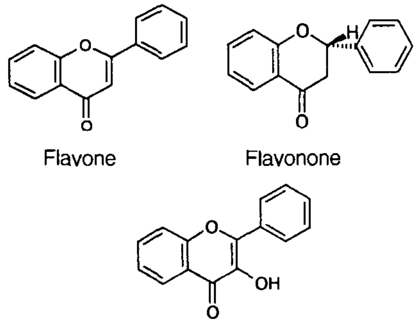

Fig. 1. Flavone, flavonone and flavonol components of propolis

2.2 프로폴리스의 항균활성

프로폴리스는 꿀벌이 수목에서 채취한 수액과 꿀벌 자신이 분비하는 타액을 혼합하여 만들어낸 물질로 벌집의 빈틈을 발라 벌집을 보호하는데 사용된다. 벌집의 빈틈이나 내부의 벽에 발라두면 벌집에 침입하는 벌레나 박테리아 또는 빗물 등으로부터 벌집의 내부를 지킬 뿐 아니라 내부가 거의 무균 상태로 되기 때문에 그 안의 꿀벌의 유충이 안전하게 자란다. 벌집의 내부가 무균상태로 되는 것은 프로폴리스에 살균력이 있다는 것을 증명해 주고 있다[2].

프로폴리스의 에탄올 추출물의 주요 성분은 pinocembrin, galangin, caffeic acid phenetly ester 등 이다. 프로폴리스가 균주의 성장을 저해하는 항균 작용기작은 프로폴리스의 성분들이 박테리아의 RNA polymerase를 저해하기 때문인 것으로 추정되며, Gram-negative 균주의 경우 세포막을 구성하는 구조의 차이와 성분에서 기인하는 것으로 보인다[16].

3. 실험

3.1. 실험 재료

강원도 홍천 지방에서 채취한 천연 프로폴리스를 망에서 털어낸 후 육안으로 이 물질을 제거하고 9 mesh(2 mm)의 체를 통해 거른 후 암소・냉동(-20 ℃) 보관하여 사용하였다.

3.2 실험 기기

본 실험에서 초음파 조사, 원심분리, 유효 성분의 함량 측정을 위하여 Ultrasonic cleaner (Hwashin 405; 350 W, 40 Khz), Brushless DC motor centrifuge(Vsion, Us-5000n), UV-VIS spectrophotometer(Hewlett Packard, 8452A)의 기기를 사용하였다. 시험균의 농도 및 OD(Optical Density)는 UV-VIS spectrophotometer를 사용하여 농도를 측정하였다. MHA 및 MHB 배지의 멸균을 위하여 고압증기멸균기(Autoclave)를 이용하여 실험시료의 멸균처리를 실시한 후 균배양 실험을 행하였다. 세균 접종 및 배지의 도말작업은 무균실(Safety clean bench)에서 이루어 졌으며, 배양기는 진탕 배양기(Shaking incubator)를 사용하였다.

3.3 실험 방법

(1) 프로폴리스의 추출

본 실험에서 프로폴리스의 추출은 에탄올 추출법과 초음파 추출법을 이용하여 보다 효율적인 방법을 알아보았다. 에탄올 추출에서는 추출 온도, 시간, 용매총량, 용매농도를 달리하여 연속 교반 추출하였고, 원심분리기를 이용하여 상등액과 잔류물을 분리하였다. 위 과정을 2회 반복하여 상등액을 취하고 -20 ℃에서 48시간 동안 저장한 후 필터링(Whatman No. 2, 8 ㎛)을 하여 왁스를 제거하였다. 왁스가 제거된 프로폴리스 추출물을 감압농축기로 농축하여 용매가 제거된 프로폴리스 농축물의 유효 성분을 분석하였다. 초음파 추출에서는 연속 교반에 의한 추출이 아닌 초음파를 조사하여 추출하였다.

(2) 추출 수율의 측정

프로폴리스 원괴를 5 g을 취하여 각 추출 조건에 따라 추출한 후 원심분리기를 이용하여 상등액을 취하고, Whatman No. 2 로 왁스를 제거한 후 감압 농축기로 각 추출액의 용매를 제거하여 프로폴리스의 원괴에 대한 추출물의 총고형분 함량의 백분율로 수율을 계산하였다.

(3) UV-VIS Spectrophotometer를 이용한 총 플라보노이드 분석

분쇄한 프로폴리스 시료 0.1~0.5 g을 칭량하고, 80% 에탄올 수용액 20㎖를 가해서 10분간 진탕용해한 다음 원심분리(3000 rpm, 10 min)하였다. 상등액을 취하고 잔류물은 80% 에탄올 수용액 8 ㎖를 가하여 동일한 방법으로 3회 실시한다. 얻어진 전 추출액을 합한 다음 80% 에탄올 수용액을 이용해서 총 양을 50 ㎖로 만들어서 시험용액으로 한다. 이와 같이 얻어진 프로폴리스 시험용액 0.5 ㎖를 시험관에서 분취하고, 에탄올 1.5㎖, 10% Aluminum Nitrate 용액 0.1㎖, 1M Potassium Acetate 용액 0.1㎖와 증류수 2.8㎖를 가해서 충분히 교반한다. 실온에서 40분간 방치한 후 10㎜ 셀을 이용해서 415㎚에서 시료의 흡광도를 측정했다. 이때 Blank로는 증류수를 사용하였다.

상기의 조작 중 Aluminium Nitrate 대신에 증류수 0.1 ㎖을 가한 것을 대조구로 해서 측정하였고, 시료의 흡광도와 대조구의 흡광도와의 차이를 이용해서 작성한 검량선을 이용하여 총 플라보노이드 mg/㎖를 산출하였다.

검량선을 작성하기 위하여 Quercetin을 무수물로 환산해서 50㎎칭량하고, 에탄올을 가하여 용해한 다음 정확히 50㎖로 만들었다. 이 액에 에탄올을 가해서 100, 80, 40, 20, 10배로 희석하고 각각 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1mg/㎖의 농도 액을 조제하고, 상기 조작에 따라 흡광도를 구하고 얻은 검량선을 Fig. 2에 나타내었다[12].

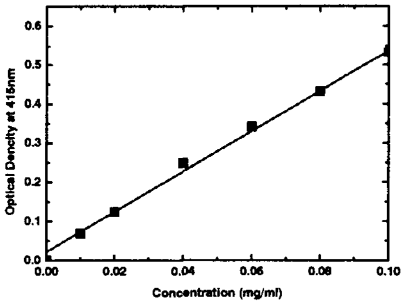

Fig. 2. Calibration curve of total flavonoid(quercetin) 검량그래프

(4) 항균 실험

Disc diffusion method를 이용한 프로폴리스 추출물의 항균 효과는 Mueller-Hinton Agar(38 g/L, Difco)를 만들어 멸균하고 멸균된 Petri dish에 4mm 정도 부어서 굳힌 후 여기에 agar 및 각 시험용 균주를 각각 0.7%, 1%첨가한 한천배지를

4~5 mm 두께로 도말하여 굳힌다. Paper dish (8 mm Φ, TOYO)에 도말된 배지를 넣은 후 그 표면에 추출된 분획물을 50$\mu\ell$씩 흡수시키고, 용매를 완전히 증발시킨 후 표면에 놓아 밀착시킨다. 그 후 균을 첨가하여 37℃에서 24시간 배양하고 균의 증식이 억제된 Paper dish의 Clear zone을 조사하여 항균활성을 측정하였다[7], [9].

OD(optical density)측정(미생물의 생육곡선 측정)을 이용한 추출한 프로폴리스 항균활성은 Mueller-Hinton Broth(21 g/L, Difco)를 만들어 멸균하고 10^6CFU/$m\ell$의 시험용 균주를 접종한 다음 여기에 추출물을 농도별(0.05, 0.1, 0.2, 0.3 mg/$m\ell$)로 첨가한 후 UV-VIS spectrophotometer (Hewlett Packard, 8452A)로 균주의 성장 정도를 파장 660 nm에서 6시간 간격으로 48시간 동안 항균활성을 측정하고, 프로폴리스 추출물을 첨가하지 않은 배지를 Blank로 하여 측정하였다[7, 9]. 항균 시험에 사용된 균주는 *Saphylococcus aureus* (KCCM 12214) 이다.

4. 결과

4.1. 프로폴리스 원괴로 부터의 프로폴리스 추출 수율

프로폴리스의 추출 실험에서 최적 추출 온도를 도출하기 위하여 추출 온도를 20, 40, 60, 80℃에서 추출 용매농도는 70% 에탄올 수용액으로 추출 용매총량을 시료 중량의 10배의 양으로 6시간 동안 각각 추출 실험을 수행하였다.

에탄올 추출물의 수율 : 추출 온도 20, 40, 60, 80 ℃에서 각각 추출된 최종 농축물의 함량은 2.02, 1.88, 1.86, 1.8g이며, 수율은 각각 40.4, 37.6, 37.2, 36%로 나타났다. 온도가 증가할수록 밀랍의 추출량도 증가하여 수율이 떨어진다고 판단된다.

초음파 추출물의 수율 : 추출 온도 20, 40, 60, 80 ℃에서 각각 추출된 최종 농축물의 함량은 2.08, 1.94, 1.92, 1.85g이며, 수율은 각각 41.6, 38.8, 38.4, 37%로 나타났다. 온도가 증가할수록 밀랍의 추출량도 증가하여 수율이 떨어진다고 판단되며, 초음파 추출물의 수율이 에탄올 추출물의 수율 보다 각각의 추출 온도에서 높게 나타났다. 초음파 에너지에 의하여, 입자들의 운동 에너지와 충격 효과의 증가[14]로 인하여 높은 추출 수율을 나타내는 것으로 판단된다.

에탄올 추출과 초음파 추출 모두 20 ℃에서 40.4%, 41.6%로 각각 높은 추출 수율을 보였는데 이는 왁스의 추출량에 기인한다. 왁스는 프로폴리스의 성분 중 하나로 약 25%이상을 차지하는데 식품 가공 및 기능성 제품 생산에 적합하지 않아 추출 공정에서 제거 하였다. 추출된 왁스를 -20 ℃에서 48시간 동안 저장하게 되면 고형화되어 필터링에 의하여 제거할 수 있다. 추출 온도가 증가함에 따라 왁스의 추출량이 증가하게 되므로, 높은 온도에서 추출된 추출물일수록 많은 왁스가 프로폴리스의 유용 성분과 함께 필터링 되기 때문에 추출 수율이 떨어지는 것으로 판단된다.

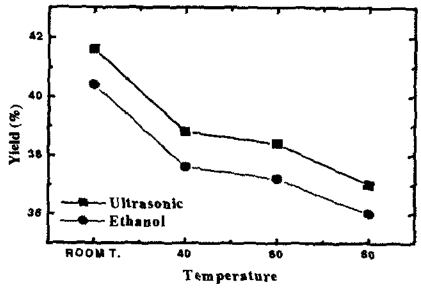

Fig. 3. Extraction yield of propolis by ultrasonic and ethanol methods at various temperatures

4.2. 추출한 프로폴리스 중의 플라보노이드 농도

프로폴리스의 추출온도에 따른 플라보노이드의 추출농도를 Fig. 4에 나타내었다. 또한, 프로폴리스 중에 함유된 총 플라보노이드 함량(w/w%)은 표준물질인 Quercetin을 이용하여 식품공전[12]에 제시된 방법에 의하여 측정하였다.

에탄올로 추출한 프로폴리스 내의 플라보노이드 농도 : 추출 온도 20, 40, 60, 80℃에서 각각 추출 실험을 수행하였으며, 총 플라보노이드가 8.6, 8.8, 9.3, 8.6%로 각각 나타났다. 총 플라보노이드가 60℃까지는 추출 온도에 따라 증가하지만, 80℃에서는 감소하였다. 이는 용매인 에탄올의 끓는점이 78℃이기 때문에 플라보노이드 성분이 에탄올과 함께 손실되는 것으로 판단된다.

초음파로 추출한 프로폴리스 내의 플라보노이드 농도 : 추출 온도 20, 40, 60, 80℃에서 각각 추출 실험을 수행하였으며, 총 플라보노이드가 9.4, 8.7, 8.5, 8.2%로 각각 나타났다. 초음파 추출의 경우는 20 ℃에서 최적 추출 온도로 판단되었는데 초음파 추출 시 낮은 온도에서 플라보노이드의 함량이 더 높게 나타나는 이유는 초음파의 온도 특성에 기인하는 것으로 판단된다.

Lorimer 등[13]도 Dextran을 용액 온도를 변화시키며 초음파 분해할 때, 저온에서 분해가 더 빠르게 진행되었다고 보고하였으며, 이러한 원인을

기포가 파괴될 때 발생하는 온도(T_{max})와 압력(P_{max})의 관계에 따른다고 하였다. 온도 증가에 따른 P_v의 감소는 T_{max}와 P_{max}의 감소를 동반하기 때문에 고온 용액에서 분해속도가 감소한다고 하였다.

에탄올 추출과 초음파 추출을 비교하였을 때 실험의 용이성과 비용을 고려하여 초음파 추출이 낮은 온도에서도 추출 수율과 총 플라보노이드 함량이 높게나와 에탄올 추출보다 유리하다고 판단된다.

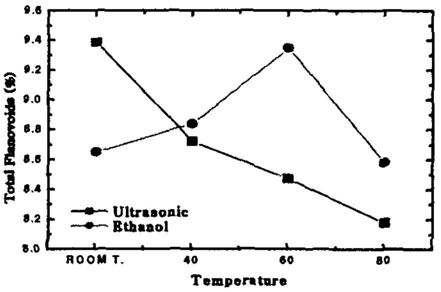

Fig. 4. Total amounts of flavonoids from extracted propolis at various temperatures

4.3. 프로폴리스의 항균활성

프로폴리스 농도별 추출물의 항균활성은 Disc diffusion method와 OD (optical density)을 이용하여 측정하였다. Disc diffusion method는 균의 증식이 억제된 Paper dish(8 mm Φ, TOYO)의 Clear zone을 조사하여 항균활성을 측정하였고,

*OD(optical density)*는 *UV-VIS* spectrophotometer (Hewlett Packard, 8452A)로 균주의 성장 정도를 파장 660 nm에서 6시간 간격으로 48시간 동안 항균활성을 측정하였다.

(1) 추출 용매농도에 따른 Disc diffusion method (감수성시험)

*Staphylococcus aureus*에 대한 프로폴리스 농도별 추출물의 Disc diffusion method 실험결과를 Table 1에 나타내었다. 에탄올 추출물과 초음파 추출물에 대한 농도별 추출물의 Clear zone을 측정한 결과 50% 에탄올 수용액 추출물에서 각각 22.5 mm, 22 mm로 가장 높은 감수성을 나타내었으며, 추출 용매농도가 높아질수록 감수성이 감소하였다. 전반적으로 초음파 추출물이 에탄올 수용액 추출물보다 감수성이 높게 나타났다.

Table 1. Antimicrobial activity of water and ethanol extracts of propolis to *Staphylococcus aureus*

Extracts of propolis	Zone of inhibition of microbial growth(mm)	
	EEP with ultrasonic	EEP
control	8	
water extract	8	8
50% EEP	22.5	22
60% EEP	19	20
70% EEP	18.5	19.5
80% EEP	18	16.5
90% EEP	18	16
99.99% EEP	17.5	15.5

Remark) EEP : Ethanol Extracts of Propolis

(2) 추출 용매농도에 따른 OD(optical density)측정

프로폴리스의 추출용매가 항균활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 추출 용매로서 물(water)과 50, 60, 70, 80, 90, 99.99% 농도의 에탄올 수용액으로 추출한 추출물로서 프로폴리스의 항균활성 실험을 수행하였다. 사용한 균주는 *Staphylococcus aureus*(KCCM 12214)로 한국미생물보존센터에서 분양받아 실험하였다.

프로폴리스에 대한 *Staphylococcus aureus*의 생육곡선은 물에 의한 추출물을 제외한 추출물에서 접종 농도 0.2mg/㎖이상인 경우 항균활성을 지속적으로 나타내었고, *Staphylococcus aureus*의 생육을 저해하는 시간이 에탄올 추출물보다 초음파 추출물이 대부분 길었으며, 특히 80% 에탄올 수용액으로 추출한 초음파 추출물이 가장 높은 항균활성을 나타내었다.

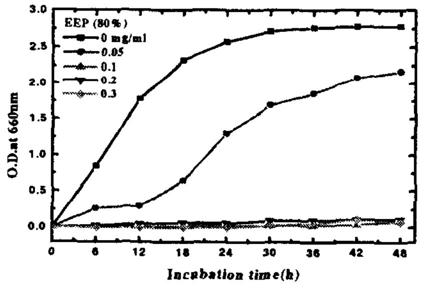

Fig. 5. Growth inhibition of 80% ethanol extracts of propolis on *Saphylococcus aureus*

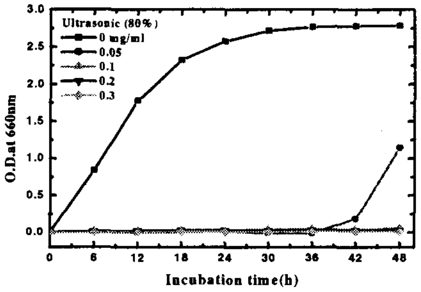

Fig. 6. Growth inhibition of 80% ethanol extracts of propolis with ultrasonic on *Saphylococcus aureus*

5. 결론

강원도 홍천지방의 천연 프로폴리스로부터 에탄올 추출법과 초음파 추출법을 이용한 프로폴리스의 효과적인 추출 방법과 프로폴리스의 농도가 미생물의 증식에 미치는 영향을 실험한 결과 아래와 같은 결론을 얻었다.

5.1 프로폴리스의 추출조건

프로폴리스의 추출 온도에 있어서 수율은 두 가지 방법 모두 20 ℃에서 가장 큰 결과를 얻었으나, 플라보노이드의 농도를 고려하여 에탄올 추출법은 60 ℃에서의 추출이 가장 적합한 조건으로 판단되었고, 초음파 추출법은 이에 반해 낮은 온도인 20 ℃에서 최적의 추출 온도로 판단되었다.

추출 시간에 따른 수율과 플라보노이드의 농도는 시간에 따라 증가된 양을 보이다 일정 시간 이후 증가폭이 감소되어 일정한 값을 유지하였다. 프로폴리스의 추출에 비용과 효율을 생각하였을 때 에탄올 추출에서는 12시간에서, 초음파 추출에서는 4시간에서 최적 추출 시간으로 판단되었으며, 초음파 추출 시 에탄올 추출보다 단 시간 동안에 높은 플라보노이드 함량을 보여 대부분의 유용성분이 추출되는 것으로 판단되었다.

추출 용매총량에서는 각각의 용매총량에서 수율과 플라보노이드의 농도 모두 초음파를 이용한 추출의 결과가 더 높게 나왔다. 에탄올 추출의 경우 20배의 용매총량, 초음파 추출에서는 15배의 용매총량이 최적조건으로 판단되었다.

프로폴리스를 물로 추출하였을 때는 플라보노이드 성분의 추출이 거의 이루어지지 않았고, 그 수율도 매우 낮았다. 에탄올 추출에서는 70% 에탄올 수용액에서, 초음파 추출에서는 80% 에탄올 수용액에서 가장 높은 플라보노이드의 농도를 보였다.

본 실험을 통해 우리는 기존의 에탄올 추출을 통한 추출보다 초음파를 이용한 추출이 낮은 온도, 짧은 시간, 적은 용매총량으로도 높은 수율과 고농도 플라보노이드의 프로폴리스 추출물을 얻을 수 있었으며, 이는 초음파를 이용한 추출이 보다 경제적이고, 효율적인 추출 방법이라고 알 수 있었다.

5.2 프로폴리스의 항균활성

*Staphylococcus aureus*에 대한 프로폴리스 농도별 추출물의 Disc diffusion method 결과 에탄올 추출물과 초음파 추출물에 대한 농도별 추출물의 Clear zone을 측정한 결과 50% 에탄올 수용액 추출물에서 각각 22.5 mm, 22 mm로 가장 높은 감수성을 나타내었으며, 전반적으로 초음파 추출물의 감수성이 높게 나타났다. 추출 용매농도가 높은 추출물일수록 지용성 성분이 많아지게 되므로 친수성인 한천배지에 확산되는 Clear zone이 작아지게 된다. 즉, 프로폴리스의 항균활성에 원인이 되는 성분인 플라보노이드 농도가 높음에도 불구하고 한천배지에 확산되지 못하기 때문에 추출 용매농도가 높을수록 감수성이 낮게 나타난다고 판단된다. 한편, 물(water) 추출물에 의한 경우에는 감수성을 나타내지 않았다.

OD(optical density)의 결과 프로폴리스에 대한 *Staphylococcus aureus*의 생육곡선은 물 추출물을 제외한 추출물에서 접종 농도 0.2 mg/㎖이상인 경우 항균활성을 지속적으로 나타내었고, 에탄올 수용액 추출물의 경우 접종 농도 0.05 mg/㎖에서 에탄올 추출물과 초음파 추출물을 비교하면, 초음파 추출물이 생육이 억제되는 시간이 길게 나타났으며, 이는 각각의 총 플라보노이드의 함량과 일치함을 보였다. 특히, 80% 에탄올 수용액 추출물의 경우 에탄올 추출물은 배양 초기부터 꾸준히 생육하여 흡광도가 2.17을 나타내었지만, 초음파 추출물의 경우 36시간 까지 생육이 저해되어 항균활성을 지속적으로 나타냈으며, 이 후 생육하여 흡광도가 1.14을 나타내었다. 따라서, 가장 적은 양으로 항균활성이 지속성을 갖기 위해서 초음파 추출방법에 의한 80% 에탄올 수용액일 때가 가장 효율적이라고 알 수 있었다.

참 고 문 헌

[1] R. Krell, “Value-added products from beekeeping”, Food and Agriculture Organi -zation of the United Nations Rome (1996)

[2] 박호용, 오현우, 박두상, 장영덕, “한국산 봉교 추출물의 항생활성”, *한국양봉학회지,* 10(1), p53-56 (1995)

[3] V. S. Bankova, S. L. de Castro and M. C. Marucci, “Propolis : recent advances in chemistry and plant origin”, *Apidologie* 31, p3-15 (2000)

[4] Lee, S. W., Kim, H. J., Hwang, B. S.,

"Studies on the chemical charateristics of Korean propolis", *Korean J. Food Sci., 21(4),* p383-388 (2001)

[5] T.P. Tim Cushine, Andrew J,Lamb, "Antimicrobial activity of flavonoids", *J. Antimicrobial Agents*, 26, p343-356 (2005)

[6] Bonvehi, J.S., Coll, F.V. and Jorda R.E., "The Composition, Active Components and Bacteriostatic Activity of Propolis in Dietetics" *J. of the Am. Oil Chem Soc.*, 71(5), p529~523 (1994)

[7] 한국미생물학회, "미생물학 실험서", 올유문화사 (1998)

[8] M. Toma, M. Vinatoru, L. Paniwnyk and T. J. Mason, "Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction", *Ultrasonics Sonochem.*, 8(2), p137-142 (2001)

[9] 이강만, "항생 물질학", 라이프사이언스 (2001)

[10] 전자기술연구회, "(알기쉬운)초음파응용", 기문사(技文社) (1989)

[11] 한국과학재단, "초음파의 응용기술" (1990)

[12] Korea Food and Drug Administration. Health Supplement Food Code. KFDA, Seoul, Korea (2006)

[13] J. P. Lorimer, T. J. Mason, T. C. Cuthbert and E. A. Brookfield, "Effect of ultrasound on the degradation of aqueous native dextran", *Ultrasonics Sonochem.*, 2(1), S55 (1995)

[14] H. M. Kingston, "Microwave-Enhanced Chemistry", Amerian Chemical Society, Washington (1997)

[15] 김영언, "Propolis로부터 유용성분의 분리, 정제 및 기능성 식품개발", 농림부 (1998)

[16] Ataç Uzel, Kadri̇ye Sorkun, Özant Önçağ, Dilşah Çoğulu, Ömür Gençay and Beki̇r Sali̇h, "Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples", *Microbiological Research*, Volume 160, Issue 2, 25 April, p189-195 (2005)

[17] Marin, A., Lopez-Gonzalvez, A., Barbas, C., "Development and validation of extraction methods for determination of zinc and arsenic speciation in soils using focused ultrasound Application to heavy metal study in mud and soils", *Analytica Chimica acta.* 442, p305-318 (2001)