

## 시험 방법에 따른 벌꿀의 항균 특성

조진식<sup>1,2</sup> · 김기환<sup>2</sup> · 이정민<sup>2</sup> · 홍금나<sup>1,3</sup> · 최민주<sup>1,3,4\*</sup>

<sup>1</sup>제주대학교 의공학협동과정, <sup>2</sup>한국화학융합시험연구원, <sup>3</sup>제주대학교 대학원, <sup>4</sup>제주대학교 의과대학 의학과

## Antibacterial Activities of Honey Measured With Different Test Methods

Jin Sik Cho<sup>1,2</sup> · Ki Hwan Kim<sup>2</sup> · Jeong Min Lee<sup>2</sup> · Geum Na Hong<sup>1,3</sup> · Min Joo Choi<sup>1,3,4\*</sup>

<sup>1</sup>Interdisciplinary Postgraduate Course in Biomedical Eng., Jeju National Univ., Jeju 63253, South Korea

<sup>2</sup>Korea Testing & Research Institute, Kyoyukwon-ro 98 Gwacheon-si, Gyeonggi-do, 13810, South Korea

<sup>3</sup>Grad. School of Jeju National Univ., Jeju 63243, South Korea

<sup>4</sup>Dept. of Medicine, College of Medicine, Jeju National Univ., Jeju 63243, South Korea

(Received July 1, 2024 / Revised August 2, 2024 / Accepted August 25, 2024)

**Abstract Background:** The antibacterial activity of honey are influenced by the testing method, however little is known about the differences between testing methods. **Objective:** The aim is to evaluate the antibacterial activities of honey according to the test method. **Methods:** The antibacterial activity was compared and evaluated according to the dilution concentration of honey using three quantitative test methods (Minimum Inhibition Concentration test: MIC test, Zone Diameter of Inhibition test: ZDI test or Halo Test, and ASTM E2315 Time-Kill Assay) for natural honey samples. **Results:** In MIC Test, it was confirmed that the growth of both *E. coli* and *S. aureus* was inhibited at 25% diluted honey. In ZDI Test, no inhibition zone was observed from the original honey solution for either *E. coli* or *S. aureus*. In the Time-Kill assay against *E. coli* strains, an antibacterial effect of more than 3 log reduction (99.9% reduction) was observed at 50% diluted honey concentration, and a log reduction of < 0.3 (approximately 50% reduction or less) was observed from 6.25% diluted honey. In the Time-Kill assay against *S. aureus* strains, a 0.5 log reduction (68.4% reduction) was observed at 50% diluted honey concentration, and a log reduction of < 0.3 (approximately 50% reduction or less) was observed from 25% diluted honey. **Conclusion:** The antibacterial activities of honey showed significant differences depending on the test method. In order to utilize the antibacterial effect of honey, it is necessary to establish a standardized quantitative antibacterial test technique.

**Key words** Honey, Antibacterial Activity, *E. coli*, *S. aureus*

**초록 배경:** 벌꿀의 항균 특성은 시험 검사법에 따라 영향을 받으나, 검사 방법에 따른 차이에 대해 알려진 바가 거의 없다. **목적:** 시험 검사법에 따라 벌꿀의 항균 특성을 평가하기 위함이다. **방법:** 천연 벌꿀 시료에 대해 3가지 정량적인 시험 검사법 (최소억제농도시험(Minimum Inhibition Concentration test: MIC test), 억제대 측정법(Zone Diameter of Inhibition test: ZDI test or Halo Test) 및 ASTM E2315 Time-Kill Assay)을 이용하여, 벌꿀의 희석 농도에 따른 항균력을 비교 평가했다. **결과:** 최소억제농도시험에서는 대장균(*E.coli*) 및 황색포도상구균(*S.aureus*) 모두 25% 희석 벌꿀 농도에서 균의 성장이 억제되는 것을 확인했다. 억제대 측정법에서는 대장균 및 황색포도상구균 모두 원액에서부터 억제대가 확인되지 않았다. 대장균 균주에 대한 Time-Kill assay에서 50% 희석 벌꿀 농도에서 3 로그 감소(99.9% 감소) 이상의 항균 효과를 보였고 6.25% 희석 벌꿀 농도에서부터 < 0.3 이하의 로그 감소(약 50% 이하 감소)를 확인했다. 황색포도상구균 균주에 대한 Time-Kill assay에서 50% 희석 벌꿀 농도에서 0.5 로그감소(68.4% 감소)를 확인했고 25% 희석 벌꿀 농도에서부터 < 0.3 이하의 로그 감소(약 50% 이하 감소)를 확인했다. **결론:** 벌꿀의 항균 특성은 시험 방법에 유의한 차이를 보이는 것으로 나타났다. 벌꿀의 항균 효과를 활용하기 위해서는 표준화된 정량적인 항균 시험 검사 기술 확립이 필요하다.

**주제어** 벌꿀, 항균 특성, 대장균, 황색포도상구균

## 서 론

벌꿀은 *Apis mellifera* 벌이 식물의 꽃의 꿀, 살아있는 식물 부위의 분비물 등을 모아서 자연적으로 만들어내는 달콤한 물질을 말한다. 벌은 숙성 과정 동안 벌꿀을 만들기 위해 수집한 요소들을 변형하고 벌 고유의 물질과 결합시킨 다음 탈수하여 벌집에 저장하여 숙성한다(Council, 2002). 이렇게 숙성된 벌꿀은 항염증, 항돌연변이, 항암, 항균, 정균 효과와 같은 인체 건강에 좋은 효과를 주는 것으로 보고되고 있다(Albardi, 2019; Alvarez-Suarez et al., 2014).

인류의 기원 이래로 인간은 감염병 치료에 있어 자연에서 유래된 물질을 사용하여 왔으며, 벌꿀은 질병 치료에 사용되어 온 가장 오래된 물질 중 하나이다. Aristotle(BC. 350)와 Dioscorides(AD.512)가 특정한 지역 및 계절에 채취한 벌꿀로 감염성 질병(infectious disease)의 치료에 이용했다는 기록이 있는 이후로 벌꿀의 항균 성질에 대한 연구는 계속되어 왔다(Gunter, 1968, Luca et al., 2024). 부작용 없이 치료에 사용할 수 있는 자연 치유 물질로서 벌꿀에 대한 관심이 증가되면서(Samarghandian et al., 2017) 최근 수십 년 동안 임상 및 식품 매개 병원균에 대한 다양한 방식으로 과학적인 벌꿀의 항균활성 연구가 진행되었다(Balázs et al., 2023; Combarros-Fuertes, Fresno, et al., 2020; Combarros-Fuertes et al, 2019; M Estevinho, et al., 2020; Faúndez et al., 2023; Skadiņš et al., 2023; Stavropoulou et al., 2022).

벌꿀이 박테리아에 대해 보이는 항균 특성은 당 농도와 낮은 수분 함량으로 인한 산성도와 높은 점도에 영향이 있

는 것으로 알려져 있다(Albardi, 2019). 이 외에도 과산화수소와 비과산화효소 성분, 특히 메틸글리옥살(MGO), 페놀산, 플라보노이드, 단백질, 펩타이드, 비과산화효소인 글리코펩타이드 등이 꿀의 항균 활성에 영향을 미치는 것으로 알려져 왔다(Hossain et al., 2022). 항균 활성은 이러한 물리화학적 주요요인(산도, pH, 높은 당 농도, 낮은 수분 함량, 페놀산, 플라보노이드, 단백질 등)들이 단일하게 작용하기 보다는 복합적으로 작용하면서 벌꿀별로 항균효과의 다양한 정도차이를 만들어 내고 있다고 한다(Almasaudi, 2021).

벌꿀의 항균 활성은 연구를 통해 다양한 균종에서도 효과가 있음이 밝혀졌는데, *Streptococcus pyogenes*, *vancomycin-resistant enterococci*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterococcus faecalis* 등에 대해 벌꿀의 항균 활성이 보고되었다(Mohd Kamal et al., 2021).

이러한 균종들에 대한 벌꿀의 항균 활성 측정 방법은 주로 항균 물질에 대한 박테리아의 감수성을 검출하기 위한 정성적 테스트인 디스크 확산법과 항균 물질의 항균 효과 농도를 확인하는 최소 억제농도시험법을 사용한다. 억제대 측정법(Zone diameter of inhibition : ZDI)으로 알려져 있는 디스크 확산법은 먼저 연구 대상 미생물을 식염수에 현탁하여 플레이트 표면에 균일하게 접종하고 벌꿀 등의 시험물질을 접종한 종이 디스크를 플레이트 표면에 부착시킨 후 배양하여 박테리아를 플레이트 전면에 성장시킨다. 시험 물질이 항균 화합물에 감수성이 있는 경우 디스크 주

변에 "성장하지 않는" 명확하게 깨끗한 영역이 나타난다. 이 영역을 억제대(Inhibition zone)라고 부른다. 크기는 시험 용액의 확산 속도와 미생물의 민감도에 따라 달라진다. 이 외에도 최소억제농도(Minimum inhibition concentration: MIC)시험을 활용하는데 미생물 성장배지가 있는 튜브에 벌꿀과 같은 시험물질의 연속 희석액을 박테리아 현탁액과 섞는다. 배양 후 탁도를 측정하는 방식으로 박테리아 성장 억제를 확인하여 시험물질의 어떠한 특정 농도가 박테리아 성장을 억제하는지 확인한다(Bubonja-Sonje et al., 2020).

일반적으로 항균 물질의 특성 연구에서는 정량적인 항균 특성을 산출하기 위해 Time-Kill Assay 방식을 많이 사용한다. Time-Kill Assay는  $10^6$  cfu/mL(Colony Forming Unit/mL) 이상의 세균을 일정 시간 항균 물질에 접촉한 후 살아있는 박테리아수를 측정함으로써 박테리아의 %감소율 및 로그 감소율을 측정하는 방식이다. 그러나 벌꿀의 항균 특성 연구에 있어 Time-Kill Assay 연구는 많이 이루어지지 않았고 특히 제품의 항균 특성 정량 평가에 주로 사용되는 항균 시험 국제 표준을 활용한 벌꿀의 항균 시험 연구는 보고된 바 없다.

본 연구에서는 벌꿀의 항균 특성 연구를 위해 벌꿀 희석액에 대해 억제대 측정법, 최소억제농도시험법, Time-Kill Assay 측정을 진행하여 벌꿀에 대한 항균 특성 시험 방법과 결과를 비교해보고자 하였다. Time-Kill Assay 방법은 미국 단체표준인 ASTM E2315(ASTM, 2016)를 활용하여 벌꿀 희석액에 대한 항균 특성을 정량적으로 측정한다. 본 연구를 통해 벌꿀의 항균 특성 연구에 있어 표준 방법을 통한 정량적 연구의 적용 가능성 및 필요성을 고찰해보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 벌꿀 및 검액 제조

초기 시험에 사용한 천연 벌꿀(원산지: 의성)은 현지에서 구매하여 시험에 사용했다. 한국에서 천연(혹은 야생화) 벌꿀은 꽃의 종류에 무관하게 꿀벌에 의해 수집된 꿀을 말한다. 최소억제농도시험(Minimum inhibitory concentration: MIC) 및 Time-Kill Assay(ASTM E2315 표준시험)의 경우, 벌꿀의 점도를 고려하여 세균 접촉이 가능한 벌꿀 원액을 50%에서 연속적으로 희석하여 항균 시험 검액

으로 사용했고(50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%), 억제대 측정법(Zone inhibition test : ZDI 또는 Halo Test)의 경우, 벌꿀 원액을 멸균 생리 식염수로 연속적으로 희석하여 항균 시험 검액으로 사용했다(원액, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%).

### 항균시험, 최소억제농도시험(Minimum Inhibitory Concentration Test: MIC test)

시험균주(*Escherichia coli* : *E.coli*, ATCC 25922 및 *Staphylococcus aureus* : *S. aureus*, ATCC 6538)을 Tryptic soy agar(Difco)에 접종하여  $(35 \pm 2)$  °C에서 (18 - 24)시간 배양했다. 균 배양액을 생균수  $1 \times 10^6$  CFU/mL가 되도록 CAMHB(Cation Adjusted Mueller Hinton Broth, Merck)배지에 희석하여 시험균액으로 사용했다. 벌꿀원액을 100 %의 농도로 설정하고 시험 용액으로 사용했다. CAMHB 배지를 이용하여 시험 용액을 2배씩 단계 희석하고 각 농도별 시험 용액 1 mL를 (13 x 100) mm 튜브에 분주하였다. 농도별 시험 용액이 분주된 튜브에 시험균액을 1 mL씩 접종하였다. CAMHB 배지 2 mL를 넣은 튜브를 양성 대조균으로, CAMHB 배지 1 mL와 시험균액 1 mL를 넣은 튜브를 음성 대조균으로 사용했다. 시험균액의 처리가 완료된 튜브는  $(35 \pm 2)$  °C에서 (16 - 20)시간 동안 배양했다. 배양 후 각 튜브에서 균의 생장 여부를 육안으로 관찰했을 때, 균이 자라지 않은 최소 농도를 최소억제농도(MIC)로 한다. 이 때 균의 증식이 관찰된 경우를 "+", 관찰되지 않은 경우를 "-" 로 표기했다. 배양 후 양성 대조균에서는 균의 증식이 없어야 하며, 음성 대조균에서는 균의 증식이 관찰되는 결과만을 채택한다.

### 항균 시험, 억제대 측정법(Zone Diameter of Inhibition Test : ZDI test 또는 Halo test)

시험균주(*E.coli*, ATCC 25922 및 *S.aureus*, ATCC 6538)을 Tryptic soy agar에 접종하여  $(35 \pm 1)$  °C에서 (18 ~ 24) 시간 동안 배양했다. 배양된 균주를 멸균 생리 식염수에 현탁하여  $(1 \sim 9.9) \times 10^6$  CFU/mL이 되도록 조정하여 시험균액으로 사용하였다. 벌꿀의 원액을 100 %의 농도로 설정하고 시험 용액으로 사용했다. 멸균생리식염수를 이용하여 시험용액을 2배씩 단계희석하여 각 농도별 시험 용액을 제조했다. 미리 준비된 Tryptic soy agar 위에 균주

배양액을 멸균된 면봉으로 고르게 접종하고 여기에 농도 별 시험용액 20 µL을 접종한 직경 6 mm짜리 종이 디스크 (paper disc)를 올려놓았다. 이후, (35 ± 2) °C에서 (16 - 20)시간 동안 배양하여 생성된 억제대(Zone of inhibition)의 지름을 [식1.]에 따라 측정한다.

억제대 계산 [식1.]

$$W = \frac{(T - D)}{2}$$

- W : 억제대의 폭 (mm)
- T : 시편과 억제대의 전체지름 (mm)
- D : 시편의 지름 (mm)

항균 시험, Time-Kill 표준 항균 시험(Time-Kill Assay, ASTM E2315)

전배양된 균(*E.coli*, ATCC 25922 및 *S.aureus*, ATCC 6538)을 생균수가 (1.0 ~ 9.9) × 10<sup>8</sup> CFU/mL가 되도록 멸균 생리 식염수에 희석하여 시험균액으로 사용했다. 벌꿀 희석액 20 mL에 시험균액 0.2 mL를 첨가하여 혼합한 후 (22 ± 2) °C에서 6시간 방치했다. 최초 희석은 D/E neutralizing broth를 이용하여 실시했다. 중화된 시험액은 단계별로 희석하여 각 농도당 Petri dish 2매에 1 mL씩 분주했다. 미리 준비된 (45 ~ 50) °C의 Tryptic soy agar를 Petri dish에 (15 ~ 25) mL 분주하고, 상온에서 응고시켰다. 응고된 Petri dish는 거꾸로 하여 (35 ± 1) °C에서 (24 ~ 48)시간 동안 배양했다. 시험은 각 균주당 2회 반복하여 실시하였으며, 초기 및 대조생균수의 측정은 멸균생리식염수를 사용하여 실시했다. 배양 후, 생균수의 관찰은 (15 ~ 150)개를 나타내는 Petri dish를 선택하여 실시했다. 세균이 증식한 경우, 배지상의 균수에 희석 배수를 곱하여 산출했다. 생균수 계산은 [식2.]에 따라 측정하였고, Log reduction은 [식3.]에 따라 결정했다.

생균수 계산 [식2.]

$$N = C \times D$$

- N : 생균수
- C : 집락수 (2매의 집락 수 평균치)
- D : 희석배수

로그 감소값(Log reduction) 계산 [식3.]

$$LR = \text{mean log (microbial population)} - \text{mean log (surviving test population)}$$

단, Log 값은 소수점 둘째 자리까지 표기하며 - 값이 도출되는 경우에는 0.00으로 표기한다.

결 과

벌꿀 희석액에 대한 *E.coli* 및 *S.aureus* 최소억제농도 시험(MIC Test)

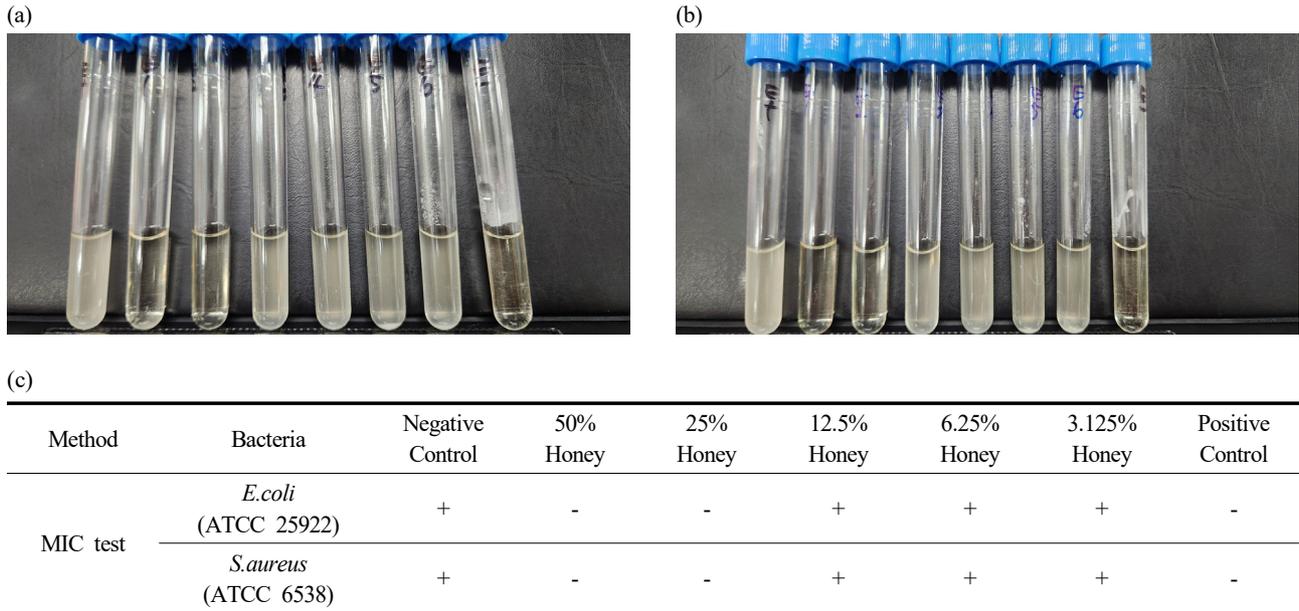
벌꿀 희석액 50%에서 연속적으로 희석하여 3.125%까지의 벌꿀에 대하여 *E.coli* 및 *S.aureus*에 대한 최소억제농도 시험을 진행했다(Fig. 1). 24시간의 벌꿀과 박테리아의 동시배양 결과, *E.coli*와 *S. aureus* 모두 25% 희석벌꿀에서 박테리아의 억제현상이 나타났다(Fig 1c). 벌꿀의 *E.coli* 및 *S.aureus*에 대한 항균효과는 25% 희석벌꿀 이상에서는 잘 나타나고, 본 시험 조건상 최소억제농도(MIC)는 25%로 판단된다. 음성 대조에서는 세균이 증식되었고 양성 대조에서는 세균이 증식되지 않아 시험의 유효성이 있는 것으로 판단된다(CLSI, 2018).

벌꿀원액 및 벌꿀희석액에 대한 *E.coli* 및 *S.aureus* 억제대 측정법(ZDI Test)

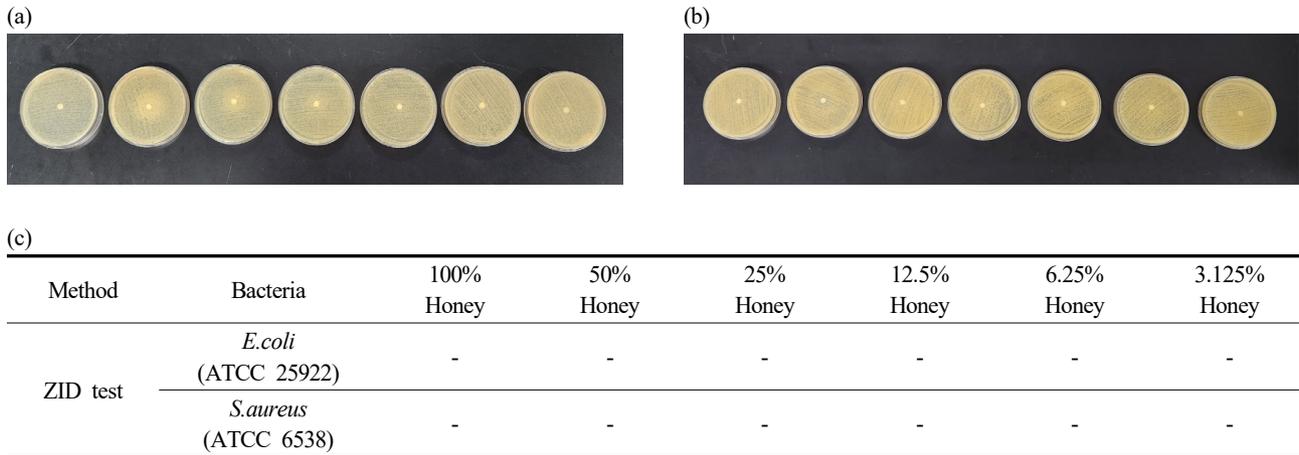
벌꿀원액 및 희석액 50%에서 연속적으로 희석하여 3.125%까지의 벌꿀에 대하여 *E.coli* 및 *S.aureus*에 대한 억제대 측정법을 진행하였다(Fig. 2). 시험결과 모든 벌꿀 시험균에서 *E.coli*와 *S. aureus* 모두 억제대가 관찰되지 않았다(CLSI, 2012).

벌꿀 희석액에 대한 *E.coli* 및 *S.aureus* Time-Kill 표준 항균 시험(ASM E2315)

벌꿀 희석액 50%에서 연속적으로 희석하여 3.125%까지의 벌꿀에 대하여 ASTM E2315 표준에 따라 *E.coli* 및 *S.aureus*에 대한 항균시험을 진행했다(Fig. 3). 항균시험 결과, *E.coli*에서는 50% 벌꿀 희석액이 3 로그(99.9%) 이상의 높은 감소율을 보였으나 *S.aureus*에서는 0.50(68.4%) 수준의 감소율 차이를 보였다. *E.coli*에서는 벌꿀의 희석 배수에 따라 항균 효과도 점차적으로 감소하여 6.25% 희



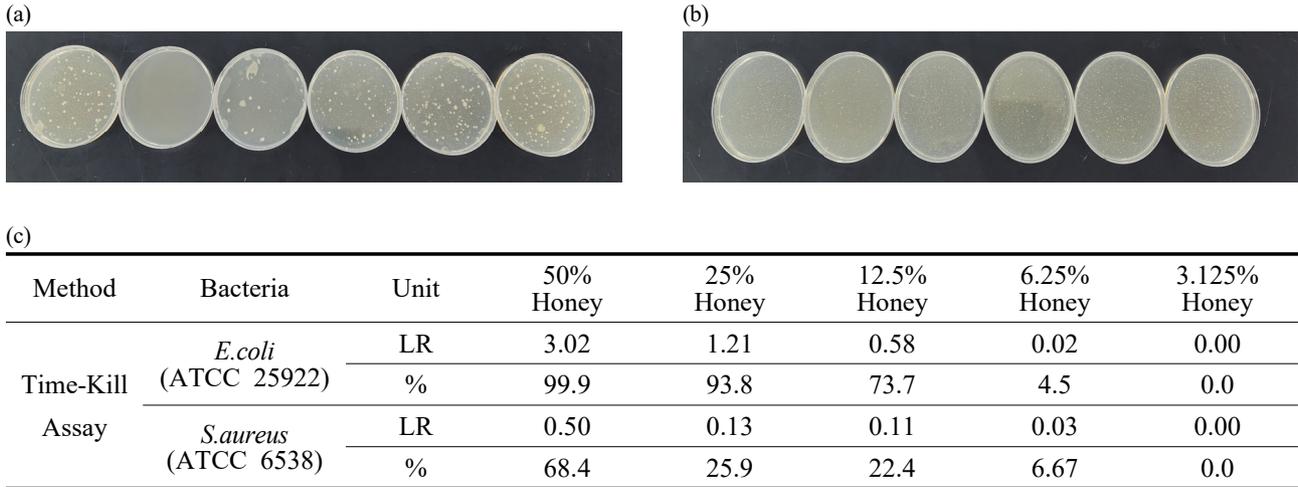
**Fig 1.** Antibacterial Activity of Diluted Honey (50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%) using MIC test : (a) Antibacterial Activity on *E. coli*. The order from left to right, negative control, honey-treated group: 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%, and positive control. (b) Antibacterial Activity on *S. aureus*. The order from left to right, negative control, honey treated group: 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%, and positive control. (c) Table showing the results of MIC test, MIC stands for Minimum Inhibition Concentration



**Fig 2.** Antibacterial Activity Test of Diluted Honey (50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%) using ZDI test : (a) Antibacterial activity of honey on *E. coli*. The order from left to right, control group, and honey-treated group : 100% 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%. (b) Antibacterial activity of honey on *S. aureus*. The order from left to right, control group, and honey-treated group : 100% 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%. (c) Table of the Result of ZDI test, ZDI means Zone Diameter of Inhibition.

석 벌꿀에서는 0.02 로그(4.5%) 감소율로 log 0.3(50%) 이하 세균 감소율을 보였다(Fig. 3c). 본 실험을 진행한 공인 시험검사기관(한국화학융합시험연구원)의 표준시험 오차 범위(±0.36 로그감소율)를 고려하면 6.25% 희석벌꿀에서

는 *E. coli*에 대한 항균효과가 나타나지 않는다고 판단된다 (ISO 17025, 2017). *S. aureus*에서 역시 25% 희석 벌꿀부터 항균 효과가 나타나지 않는다고 판단된다.



**Fig 3.** Antibacterial Activity of Diluted Honey (50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%) using the ASTM E2315 Time-Kill Assay : (a) Antibacterial Activity on *E.coli*. The picture is one sample from the 10<sup>3</sup> diluted plates of bacteria-honey mixture. The order from left to right, control group, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125% diluted honey. (b) Antibacterial activity of honey on *S. aureus*. The picture is one sample from the 10<sup>3</sup> diluted plates of bacteria-honey mixture. The order from left to right, control group, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125% diluted honey. (c) Table of the Result of Time-Kill Assay, LR means Log Reduction of bacteria, % represents the percentage reduction of bacteria. The values represented in the table are the average from two replicate experiments.

## 토 의

본 연구에서는 벌꿀의 항균 특성을 평가하기 위해 정성적 항균 시험 측정법인 최소억제농도시험, 억제대 측정법과 정량적 측정법인 ASTM E2315 Time-Kill 표준시험법을 활용하여 대장균(*E.coli*) 및 황색포도상구균(*S.aureus*)에 대한 항균 시험을 진행했다. 시험을 진행한 결과, 동일한 벌꿀 및 균주에 대해서 시험 방법별로 상이한 결과값이 나왔다. 최소억제농도시험에서는 두 균주 모두 25% 희석 벌꿀에 대해 항균 활성을 갖는 반면 억제대 측정법에서는 원액 벌꿀에서도 항균 활성을 관찰하기 어려웠다. Time-Kill 표준 시험법에서는 대장균의 경우, 50% 벌꿀희석액이 로그 3(99.9%)이상의 세균을 감소시키는 항균력을 보였고, 황색 포도상구균의 경우, 50% 벌꿀 희석액이 로그 0.5(0.68%)의 세균을 감소시키는 항균력을 보여 균종에 따른 벌꿀의 항균효과 차이를 관찰할 수 있었다.

최소억제시험법과 Time-Kill 표준시험법간의 항균력 차이는 우선 벌꿀과 세균의 접촉 시간이 각각 24시간, 6시간으로 차이가 있어 단순히 벌꿀 항균력을 방법론으로 비교하는 것에는 문제가 있다. 그러나 최소억제시험법이 세균을 완전히 억제하는 농도를 초기 모니터링하는 방법으로 주로 사용되고 항균력에 대한 정성적 초기 항균물질 농도

값을 제시해주는 데 반해, Time-Kill 시험법은 정량적 항균 특성값을 수치 단위로 도출하고 있어 벌꿀의 항균 효과를 측정하는데 정량적이고 더욱 정밀한 결과값을 줄 수 있을 것으로 보인다. 억제대 측정법의 경우 기존 문헌에서 제시되고 있는 벌꿀의 항균 효과를 전혀 관찰할 수 없었다. 이는 억제대 측정법의 가장 큰 단점인 재현성의 문제와 적용하는 항균 물질의 특성 문제가 반영된 결과로 보인다. 금번 연구에 사용된 벌꿀의 항균 특성이 없을 수도 있겠지만, 벌꿀 점도로 인한 확산의 문제, 디스크에 적용되어야 하는 벌꿀량의 문제 및 플레이팅되는 세균 농도 수준 등이 매 시험 때마다 변동될 수 있어, 억제대 측정법을 통한 벌꿀의 항균 시험의 재현성과 정밀도 해석에 주의가 요구된다(Bonbonja-Sonje et al, 2020).

정성적 항균 시험의 단점을 극복하고 벌꿀의 정확한 항균 특성을 연구하기 위해서는 금번 연구에 진행한 Time-Kill 표준시험법과 같은 정량 시험을 병행하여 진행할 필요성이 있다. 다른 정성적 항균 시험에 비해 Time-Kill 표준시험법은 항균 물질의 항균력을 나타내는데 더 정확한 결과값을 주고(Mandal & Mandal, 2011) 벌꿀의 적용 시간 및 양을 조절하거나 다양한 세균을 적용하는데 제약이 적어 벌꿀의 항균 특성 측정에 효과적일 수 있다. 특히 국제 표준 시험 방법의 적용으로 벌꿀과 같이 판매되는 제품의 항균 특성

값에 대한 신뢰성을 줄 수 있다. 물론 인적 및 시험 시간적 소요가 높고 상대적으로 많은 재료와 공간이 필요하다는 단점은 극복해야 될 과제이다(Bonbonja-Sonje et al, 2020).

금번 Time-Kill 표준시험법 연구에서는 항균 시험에 있어 대표적으로 사용되는 그람음성균인 대장균과 그람 양성균인 황색포도상구균을 활용하였다. 특이적으로 그람음성균인 대장균의 벌꿀에 대한 항균 감수성이 높은 것으로 나타났다. 그람음성균은 얇은 펩티도글리칸(peptidoglycan) 세포벽으로 둘러싸여 있으며, 그 자체가 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide)를 함유한 외막으로 둘러싸여 있고 그람양성균은 외막이 없지만 그람음성균에서 발견되는 것보다 몇 배나 두꺼운 펩티도글리칸 층으로 둘러싸여 있어 일반적으로 그람음성균이 그람양성균에 비해 저항성이 더 높은 것으로 알려져 있다(Silhavy, 2010). 그러나 본 연구에서는 그람양성균인 황색포도상구균이 벌꿀에 대해 더 높은 저항성을 가지고 있어 벌꿀의 다양한 항균인자가 균종별 항균 차이를 발생할 수 있다는 점을 고려하게 한다. 추가적인 Time-Kill 표준시험법을 통한 벌꿀의 균종에 대한 항균 특성 차이 연구를 통해 벌꿀의 항균 특성을 발생하는 요인에 대한 이해를 높여야 할 것으로 보인다.

일상적인 환경에서 영양 제공 뿐만 아니라 자연 치유의 목적으로 자주 사용되는 벌꿀의 활용도를 고려하면, 벌꿀의 항균 효과가 어느 정도의 희석 수준까지에서 나타나는지에 대한 정보는 유용하다. 이러한 정보들은, 벌꿀 종류 및 다양한 균종에 대한 항균 데이터까지 축적된다면, 벌꿀의 치유적인 효과의 활용을 높여줄 것으로 예상된다. 벌꿀에 대한 항균 시험 연구가 뉴질랜드의 마누카 꿀(Hillitt et al., 2017, Carter et al, 2016, Stagos et al., 2018, Goslinski et al., 2020)에서 상당히 이루어져 해당 상품 가치가 높아지는 상황을 고려해볼 때, 그리 많은 연구가 이루어지지 않은 국내산 벌꿀에 대해 정량적 표준시험법을 활용한 항균 특성 비교 연구는 국내산 벌꿀 제품의 가치를 높여줄 수도 있을 것으로 기대된다(정동현, 백승화, 2002).

## 결 론

본 연구를 통해 항균 특성이 있다고 알려진 벌꿀의 항균 특성 측정 방법들을 비교해 보았다. 동일한 벌꿀에 대해, 일반적으로 진행되는 정성적인 항균 특성 평가 방법과 국

제 표준 항균 시험법에 기반한 정량적 Time-Kill 표준시험법은 상이한 항균 특성값을 제시하고 있다. 자연 치유적으로 활용될 수 있는 벌꿀의 항균 특성에 대한 정확하고 깊은 이해를 돕기 위해서 국제 표준에 기반한 정량적 평가를 바탕으로 체계적인 추가 연구가 제안 된다.

## Acknowledgment

이 논문은 2024학년도 제주대학교 교육·연구 및 학생지도비 지원에 의해서 연구되었음.

## References

- 정동현, 백승화. 2002. *Staphylococcus aureus*에 대한 벌꿀의 항균 활성. *한국식품영양학회지* 15(2): 158-164.
- Albaridi, N.A. 2019. Antibacterial potency of honey. *Int J Microbiol.* 2009(1): 1-10. <https://doi.org/10.1155/2019/2464507>
- Almasaudi, S. 2021. The antibacterial activities of honey. *Saudi J Biol Sci.* 28(4): 2188-2196. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.10.017>
- Alvarez-Suarez, J., M. Gasparrini, T. Forbes-Hernandez, L. Mazzoni, and F. Giampieri. 2014. The composition and biological activity of honey: A focus on Manuka honey. *Foods* 3(3): 420-432. <https://doi.org/10.3390/foods3030420>
- ASTM E2315. 2016. Standard Guide for Assessment of antimicrobial Activity Using a Time-Kill Procedure. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- Balázs, V.L., L. Nagy-Radványi, E. Bencsik-Kerekes, R. Koloh, D. Szabó, B. Kocsis, M. Kocsis, and Á. Farkas. 2023. Antibacterial and antibiofilm effect of unifloral honeys against bacteria isolated from chronic wound infections. *Microorganisms* 11(2): 509. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020509>
- Bubonja-Šonje, M., S. Knežević, and M. Abram. 2020. Challenges to antimicrobial susceptibility testing of plant-derived polyphenolic compounds. *Arh Hig Rada Toksikol.* 71(4): 300-311. <https://doi.org/10.2478/aiht-2020-71-3396>

- Carter, D.A., S.E. Blair, N.N. Cokcetin, D. Bouzo, P. Brooks, R. Schothauer, and E.J. Harry. 2016. Therapeutic manuka honey: no longer so alternative. *Front Microbiol.* 7: 569. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00569>
- CLSI M02-A11. 2012. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Eleventh Edition.
- CLSI M07-Ed11. 2018. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-11th Edition.
- Combarros-Fuertes, P., J.M. Fresno, M.M. Estevinho, M. Sousa-Pimenta, M.E. Tornadijo, and L.M. Estevinho. 2020. Honey: Another alternative in the fight against antibiotic-resistant bacteria? *Antibiotics (Basel)* 9(11): 774. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110774>
- Combarros-Fuertes, P., L.M. Estevinho, R.G. Teixeira-Santos, A. Rodrigues, C. Pina-Vaz, J.M. Fresno, and M.E. Tornadijo. 2020. Antibacterial Action Mechanisms of Honey: Physiological Effects of Avocado, Chestnut, and Polyfloral Honey upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Molecules* 25(5):1252. <https://doi.org/10.3390/molecules25051252>
- Council, EU. 2002. Council Directive 2001/110/EC of 20 December 2001 relating to honey. *Official Journal of the European Communities L*, 10: 47-52.
- Faúndez, X., M.E. Báez, J. Martínez, M.C. Zúñiga-López, J. Espinoza, and E. Fuentes. 2023. Evaluation of the generation of reactive oxygen species and antibacterial activity of honey as a function of its phenolic and mineral composition. *Food Chem.* 426: 136561. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136561>
- Gośliński, M., D. Nowak, and L. Kłębukowska. 2020. Antioxidant properties and antimicrobial activity of manuka honey versus Polish honeys. *J Food Sci Technol.* 57(4): 1269-1277. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04159-w>
- Gunter, R.T. 1968. (Reprinted) *The Greek Herbal of Dioscorides*. Hafner, New York.
- Hillitt, K.L., R.E. Jenkins, O.B. Spiller, and M.L. Beeton. 2017. Antimicrobial activity of Manuka honey against antibiotic-resistant strains of the cell wall-free bacteria *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum*. *Lett Appl Microbiol.* 64(3): 198-202. <https://doi.org/10.1111/lam.12707>
- Hossain, M.L., L.Y. Lim, K. Hammer, D. Hettiarachchi, and C. Locher. 2022. A review of commonly used methodologies for assessing the antibacterial activity of honey and honey products. *Antibiotics (Basel)* 11(7): 975. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070975>
- ISO/IEC 17025. 2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, ISO/CASCO.
- Luca, L., D. Pauliuc, and M. Oroian. 2024. Honey microbiota, methods for determining the microbiological composition and the antimicrobial effect of honey-A review. *Food Chem X* 23: 101524. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101524>
- Manda, M.D. and S. Mandal. 2011. Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pac J Trop Biomed.* 1(2): 154-160. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60016-6](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60016-6)
- Mohd Kamal, D.A., S.F. Ibrahim, H. Kamal, M.I.A.M. Kashim, and M.H. Mokhtar. 2021. Physicochemical and medicinal properties of tualang, gelam and kelulut honeys: a comprehensive review. *Nutrients* 13(1): 197. <https://doi.org/10.3390/nu13010197>
- Samarghandian, S., T. Farkhondeh, and F. Samini, 2017. Honey and health: A review of recent clinical research. *Pharmacognosy Res.* 9(2): 121-127. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.204647>
- Silhavy, T.J., D. Kahne, and S. Walker. 2010. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2(5): a000414. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>
- Skadiņš, I., K.D. Labsvārds, A. Grava, J. Amirian, L.E. Tomsone, J. Ruško, A. Viksna, D. Bandere, and A. Brangule. 2023. Antimicrobial and antibiofilm properties of latvian honey against causative agents of wound infections. *Antibiotics (Basel)* 12(5): 816. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12050816>
- Stagos, D., N. Soulioti, C. Tsadila, S. Papaconomou, C. Arvanitis, A. Ntontos, F. Karkanta, S. Adamou-Androulaki, K. Petrotos, D.A. Spandidos, D. Kouretas, and D. Mossialos. 2018. Antibacterial and antioxidant activity of different

types of honey derived from Mount Olympus in Greece. *Int J Mol Med.* 42(2): 726-734. <https://doi.org/10.3892/ijm.m.2018.3656>

Stavropoulou, E., E. Ieronymaki, E. Dimitroulia, T.C. Constantinidis, G. Vrioni, C. Tsatsanis, and A. Tsakris.

2022 Anti-inflammatory and antibacterial effects and mode of action of greek arbutus, chestnut, and fir honey in mouse models of inflammation and sepsis. *Microorganisms* 10(12): 2374. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122374>