J. Fd Hyg. Safety 18(4), 189–194 (2003)

프로폴리스 추출물의 항균 활성에 대한 연구

손영록†
해태제과 연구소 식품안전연구팀

Studies on the Antimicrobial Effect of Extracts of Propolis

Young Rok Son†
Food safety research team, HAITAI confectionery & Foods Co., Ltd. 255-9, Huam-dong, Yongsan-gu, Seoul 140-190, Korea

ABSTRACT – Approved chemical preservatives have been widely used to preserve foods and increase their shelf life. There are increasing demends of the partial or complete removal of chemical preservatives from foods because of adverse health effect of chemicals. In this study, the possibility of natural antimicrobial compounds, Korean propolis as food preservatives are investigated. Propolis samples were extracted on various concentration of ethanol. Propolis extracts extracted with 100% ethanol showed the highest inhibitory effect against food spoilage microorganisms. The 100% ethanol extracts of propolis were selected and the antimicrobial activities of 100% ethanol extracts of propolis against several food spoilage microorganisms were examined. *Bacillus subtilis, Micrococcus luteus, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Shigella sonnei, Salmonella choleraesuis, Erwinia rhapontici, and Vibrio parahaemolyticus* as food poisoning microorganisms were chosen for the examination. The Propolis extracts had antimicrobial activity against food spoilage microorganisms. When the microorganisms were treated with propolis extracts, the population of food spolige microorganisms were decresed by 1~9 log.

Key words: Propolis, natural antimicrobial compounds, antimicrobial effect

식품의 변패 변질을 최소로 하기 위한 노력으로 다양한 식품저장방법을 이용하고 있다.[1-2] 식품의 변패, 변질의 원인이 되는 것은 생물에 의한 것, 효소 반응에 의한 것, 화학 반응에 의한 것, 물리적 변화에 의한 것이 있는데 이러한 식품 변패 원인 중 생물 특히 미생물에 의한 변패가 가장 중요하다. 이러한 미생물에 의한 식품의 품질저하를 방지하고 식품을 안정화 시키기 위해 물리적, 화학적, 미생물에 의한 식품 저장방법이 단일한 방법 또는 2개 이상의 수단이 병용되어 식품의 저장성 향상 목적을 달성하는데 이용되고 있다.[1-3] 다양한 식품저장 방법을 식품에 처리하는 동안 발생할 수 있는 제품의 물리적, 화학적 혹은 미생물의 생태학적인 변화[4-7]는 제품의 품질 저하나 병원성 세균의 성장을 가능하게 하여 바람직하지 않은 효과를 가져올 수 있고, 부패에 관여하는 미생물의 수를 감소하기 위해 사용되는 화학적인 수단의 보존제는 점차로 그 유해성이 많이 야기됨에 따라 최근에 소비자들의 태도는 화학적인 보존제의 이용보다는 식물이나 미생물 등의 급원을 이용한 천연적인 항균제에 대한 관심이 커졌다. 천연물 중에 상당한 항균성 물질을 갖는다는 것은 예전부터 전해오고 있는 사실이고 이로 인하여 현재에도 천연항균성 물질의 검색과 이들을 이용한 식품보존 측면에서의 연구가 활발히 진행 중이다.[8-9]

프로폴리스는 벌들이 다양한 식물의 진액물질을 채취할 때 효소(침)를 첨가시켜, 뜯어낸 뒤 밀납 등을 넣어 몇 개월간 30°C가 넘는 온도에서 숙성시켜 벌들이 사용하기 가장 좋도록 만들어 놓은 물질이다.[10-11] 이러한 식물의 진과 벌의 타액이 결합하여 만들어진 자연 항생 물질인 프로폴리스는 우수한 항균, 살균, 항염작용을 하는 성질을 가지고 있어 벌들은 이 프로폴리스를 벌집출입구에 발라 외부로 부터 바이러스나 해로운 세균의 유입을 원천적으로 막고, 벌집 내부를 항상 청결한 상태로 유지하게 된다.[12-15] 프로폴리스 성분으로는 지금까지 약 150종 이상의 화합물이 알려져 있으며 주성분은 polyphenol이며 polyphenol로서는 비당부로서 flavonoid, phenolic acid 및 ester, phenolic aldehyde, ketone, 다량의 왁스수지, 발삼, 정유, 화분 등이 있으며 그 외에 각 종 비타민 및 미네랄 등도 함유되어 있다. 이러한 성분은 산지나 채집시기 및 주변의 식물 등에 따라서 차이가 있으며 함량도 다르고 효능에도 다소 차이가 있다.[16]

프로폴리스는 항염증, 항균, 살균, 항알레르기, 생체면역 강

†Author to whom correspondence should be addressed.

화작용, 면역력 활성화작용, 세포활성화, 세포재생작용, 피부병, 화상 등에 대한 효과[17,18]가 있으며 이외에도 제암, 살암작용, 항암제 부작용 경감작용으로 인해 간보호기능을 지니고 있으며 과산화반응 억제작용을 하고, 구강악취 제거에 대한 효과가 있어 치약 등에 이용되고 있으며14, 15 19), 박테리아에 의한 단백질합성을 억제하여 미생물에 대한 항균작용을 담당한다.[14]

본 연구에서는 기존에 식품의 저장성 향상을 위해 사용되어졌던 방법들의 문제점들을 최소화하고 보다 효과적인 식품저장을 위해 전통적으로 식용되어 왔으며 그 안전성이 확보된 프로폴리스를 대상으로 대표적인 식품 부패 미생물에 대한 생육억제활성을 탐색하고 살균효과를 살펴보고자 하였다. 이러한 연구를 통해 건강 지향적인 식품보존제로서 천연항균제를 식품에 적용하여 보다 좋은 품질의 가공식품 개발에 활용하고자 한다.

실험 재료 및 방법

실험 재료

프로폴리스는 강원도 원주지역에서 채집된 것을 4°C에 저장하면서 실험의 재료로 사용하였다. 실험에 사용한 균주는 식품의 변패 및 부패 유발과 더불어 식중독을 유발하는 유해세균으로서 많이 알려져 있는 *Bacillus subtilis*(KCCM 12027, ATCC 15245), *Micrococcus luteus*(KCCM 11211, ATCC 10240), *Esherichia coli*(KCCM 11234, ATCC 25922), *Staphylococcus aureus*(KCCM 12256, ATCC 25923), *Bacillus cereus*(KCCM 11204, ATCC 11778), *Shigella sonnei*(KCCM 11903, ATCC 11060), *Salmonella choleraesuis*(KCTC 2425, ATCC 33459), *Erwinia rhapontici*(KCCM 35497, ATCC 29283), *Vibrio parahaemolyticus*(KCCM 11965, ATCC 17802)의 9종의 균을 선정하여 한국종균협회와 유전자은행으로부터 분양 받아서 사용하였다.

실험방법

프로폴리스의 일반 성분 분석 – 프로폴리스의 일반성분은 A.O.A.C.방법[20]에 따라 분석하였다. 즉 수분함량은 105°C 상압가열건조법, 조지방은 Soxhlet법, 조회분은 건식회화법으로 측정하였다. 조단백질은 Semimicro Kjeldahl법으로 정량하였다.

균주 배양 – 전 균주는 nutrient agar(0.3% beef extracts, 0.5% peptone, 1.5% agar)에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 냉장고에 보관하여 사용하였다. 실험재료로 쓰기 위해 nutrient broth(0.3% beef extracts, 0.5% peptone)에 접종한 후 37°C에서 24시간 전 배양하였고 이후 본 배양을 실시하여 초기 균수를 10^8~10^9/mL으로 조정한 후 시료로서 사용하였다.

항균성 검색

프로폴리스 추출물의 제조 – 프로폴리스 추출물을 얻기 위해 원주지역에서 채취한 시료를 중량대비 3배에 해당하는 에탄올을 처리한 후 24시간 추출하여 8000 rpm에서 20분 원심분리를 실시하였다. 상등액을 여과지(Whatman No. 41)로 여과하고 그 여액을 취하여 회전농축기를 이용하여 감압 농축한 후 농축한 추출물을 최소량의 물에 녹여 항균력을 검정하였다.

생균수 측정 – 생균수 측정은 A.O.A.C.방법[20]에 따라 측정하였다. 추출물로 처리된 각 균은 37°C에서 24~48 시간 배양한 후, 배양액을 0.1% peptone water(1% peptone, 0.5% NaCl)로 단계 희석하였으며, nutrient agar상에 0.1 mL씩 분주한 후 도말하여 37°C에서 24시간 배양한 후 형성된 colony를 계수하였다. 생균수 측정은 3회 반복하였다.

결과 및 고찰

프로폴리스의 일반 성분 분석

프로폴리스의 일반성분 분석결과는 수분 19.41%, 조단백 0.39%, 조지방 5.12%, 조회분 0.15%의 결과를 나타내었다.

에탄올에 의한 추출율과 항균효과

프로폴리스에 20%, 40%, 60%. 80%, 100% 에탄올을 처리하여 감압 농축한 결과 에탄올 60%, 에탄올 80% 추출물에서 가장 높은 추출율을 보였으며 에탄올의 함량이 적을수록 추출율이 떨어지는 것을 관찰할 수 있었으나 에탄올의 함

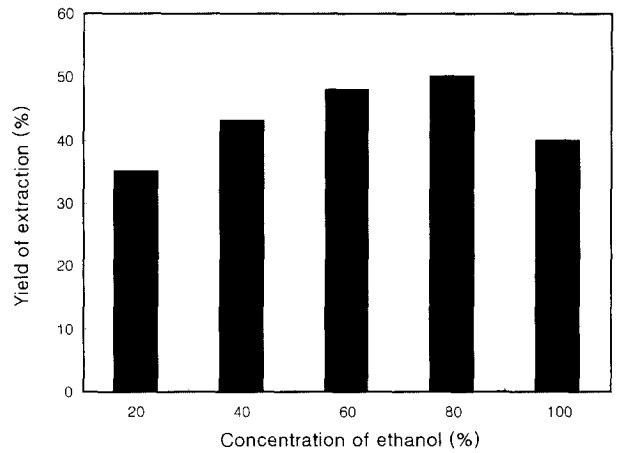

Fig. 1. Extraction yield of Korean propolis with various concentration of ethanol.

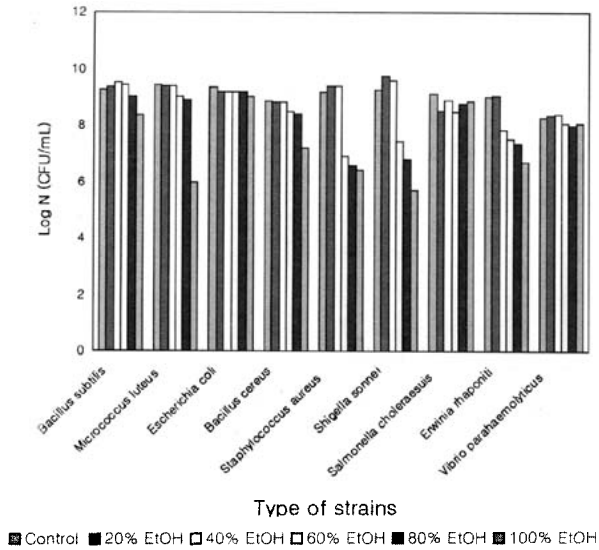

Fig. 2. Effect of Korean propolis extracts on the inactivation of food poisoning microorganisms.

량이 100%인 경우에 있어서는 추출율이 최대로 나타나지는 않았다(Fig. 1). 각각의 농축물로 유해 미생물에 대한 항균성을 검정한 결과 100% 에탄올 추출물로 실험한 처리구에서 가장 높은 항균효과를 나타내었다(Fig. 2). 프로폴리스내의 항균활성을 나타내는 성분이 물보다는 유기용매에 용출되기 쉬운 특성이 있어서 이와 같은 결과가 관찰되었다고 판단된다. 추출된 프로폴리스의 항균활성은 프로폴리스 내의 플라보노이드함량이 높을수록 비교적 그 효과가 높은데 추출용매인 에탄올의 함량이 높아질수록 플라보노이드와 그 외의 항균활성을 나타내는 성분의 추출이 많아져서 항균활성이 상승되었다는 것을 알 수 있다. 이러한 결과를 바탕으로 100% 에탄올 추출물을 사용하여 유해 미생물들에 대한 추출물의 농도별 항균 효과를 살펴보았다.

항균성 검색

***Escherichia coli*의 사멸효과** – 프로폴리스 추출물에 의한 *E. coli*의 생육저해효과를 살펴본 결과 Fig. 3에서 알 수 있듯이 대조군과 비교시 100% 에탄올 추출물 0.01~1 mg/mL

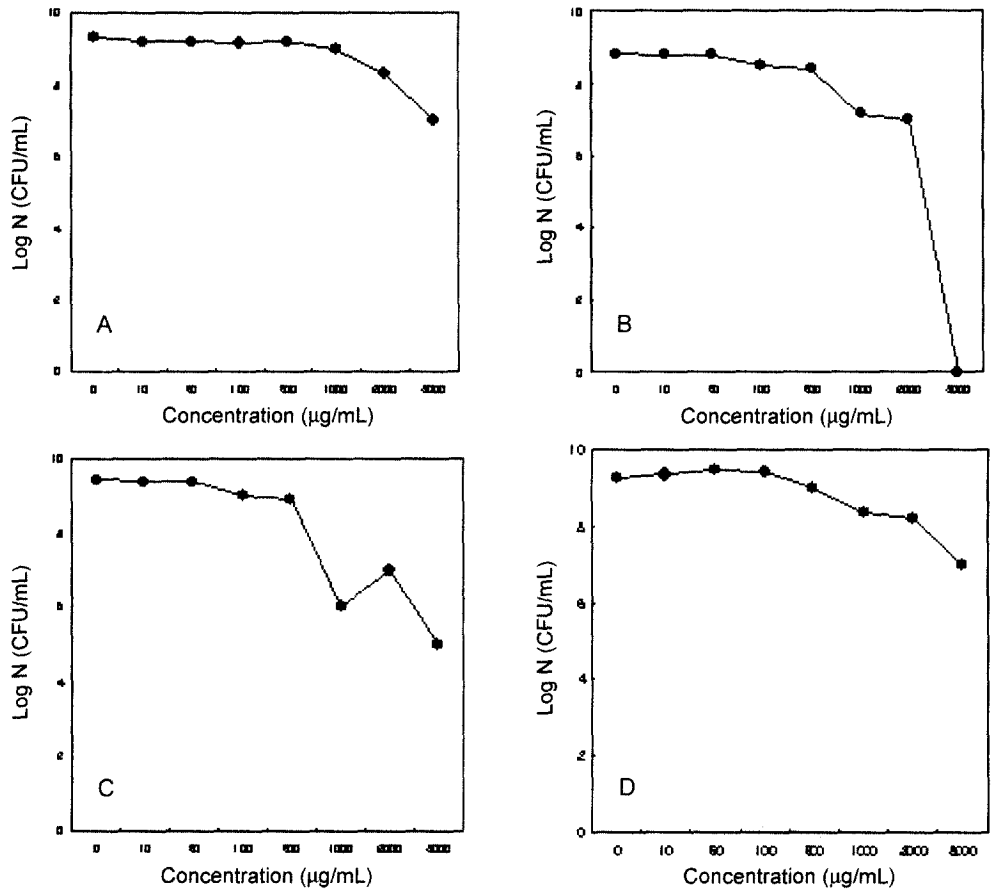

Fig. 3. Effect of concentration of Korean propolis extracts on the inactivation of A) *Escherichia coli* B) *Bacillus cereus* C) *Micrococcus luteus* D) *Bacillus subtilis*.

의 농도로 처리한 시험군에서는 생균수의 감소 결과를 관찰할 수 없었고 추출물의 처리농도를 3 mg/mL로 높였을 때 2 log 정도의 생균수가 감소되는 결과를 얻을 수 있었다.

***Bacillus cereus*의 사멸효과** – *Bacillus cereus*의 프로폴리스 추출물에 의한 사멸효과를 살펴본 결과 0.01~0.5 mg/mL로 처리했을 때는 거의 생육저지 효과를 관찰할 수 없었으나 1~2 mg/ml의 농도로 각기 처리 시 대조군에 비해 2 log 정도의 생균수가 감소하였고 3 mg/mL로 처리했을 때는 생균수가 전혀 관찰되지 않는 완전한 사멸효과를 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

***Micrococcus luteus*의 사멸효과** – 프로폴리스 추출물에 의한 *Micrococcus luteus*의 생육저지효과를 보면 처리농도 0.5 mg/mL까지는 큰 생육저해 효과를 관찰할 수 없었으나 100% 에탄올 추출물을 1 mg/mL의 농도로 처리 시 3 log 정도의 살균효과를 관찰할 수 있었으며 3 mg/mL로 처리농도를 높였을 때, 약 4 log의 생육억제 효과를 보였다(Fig. 3).

***Bacillus Subtilis*의 사멸효과** – Fig. 3의 결과를 보면 100% 에탄올로 추출한 프로폴리스 추출물을 0.01~0.5 mg/mL 농도로 처리했을 때는 생균수의 감소를 관찰할 수 없었고, 추출물의 처리농도를 1~2 mg/mL로 높였을 때 생균수가 1 log 정도 감소하였고 3 mg/mL의 농도로 처리 시 2 log 정도의 사멸효과를 관찰할 수 있었다.

***Staphylococcus aureus*의 사멸효과** – 프로폴리스 에탄올 추출물에 의한 *Staphylococcus aureus*의 사멸효과를 살펴본 결과 0.01~0.05 mg/mL의 처리농도에서는 생육저해효과를 보이지 않았고 처리농도가 0.1~3 mg/mL로 높아질수록 대조군과 비교 시 생균수가 2~4 log 정도 감소하여 점차로 사멸효과가 높아지는 결과를 나타내었다(Fig. 4). 이러한 결과는 *Scheller* 등[21]이 *Staphylococcus* 균주에 대해 프로폴리스에 의한 항균활성을 탐색한 결과보다 국내산 프로폴리스가 더 높은 항균활성을 나타내었음을 보여준다.

***Shigella sonnei*의 사멸효과** – Fig. 4의 결과에서 보여지듯이 100% 에탄올로 추출한 프로폴리스 추출물에 의한 *Shigella sonnei*의 생육억제효과는 0.01~0.05 mg/mL에서는 크게 나타나지 않았고 0.1~2 mg/mL으로 처리농도가 높아짐에 따라 2~3 log로 점차 생균수가 감소하였고 그 이상의 농도에서는 생육이 현저하게 저하되어 3 mg/mL의 농도에서는 모두 사멸되는 효과를 보였다.

***Salmonella choleraesuis*의 사멸효과** – 이 등[21]의 연구결과에 의하면, 영월, 예천산 프로폴리스는 *Salmonella* 균에

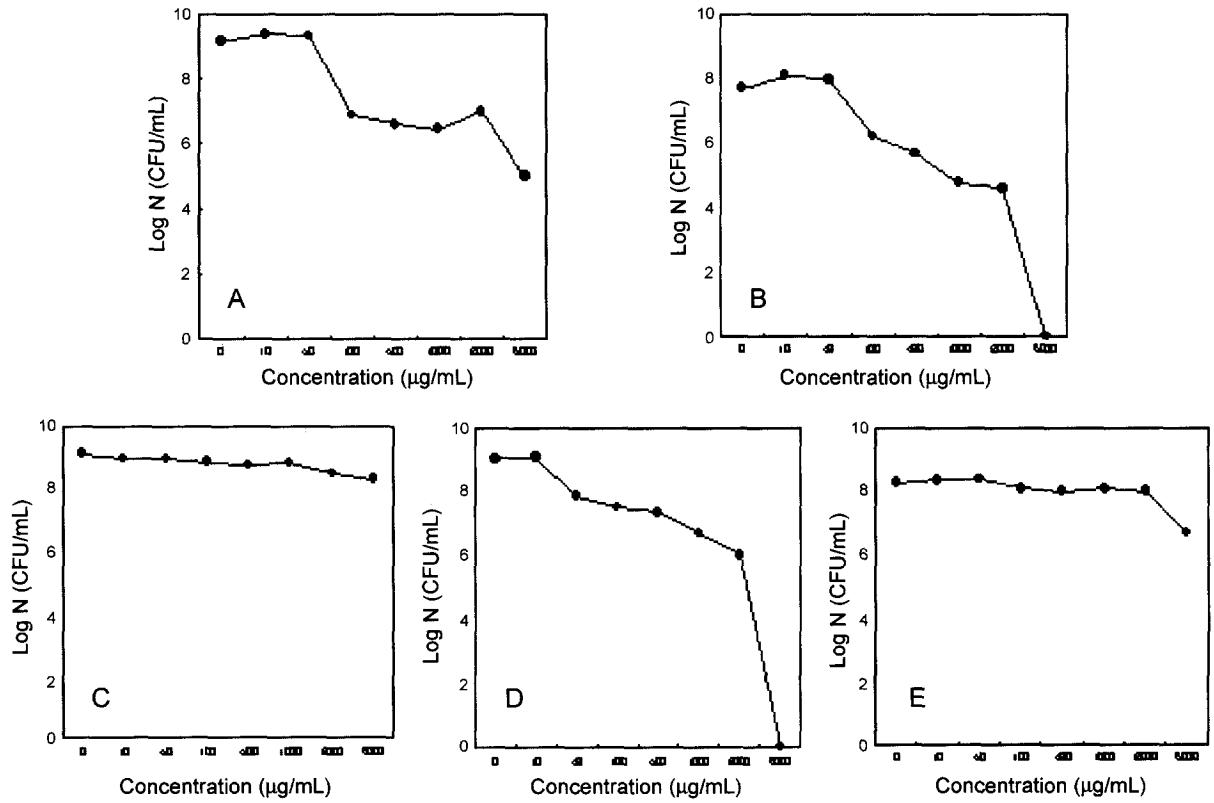

Fig. 4. Effect of concentration of Korean propolis extracts on the inactivation of A) *Staphylococcus aureus* B) *Shigella sonnei* C) *Salmonella choleraesuis* D) *Erwinia rhapontici* E) *Vibrio parahaemolyticus*.

대해 균의 성장을 억제하는 결과를 나타내었으나, 본 연구에서는 프로폴리스 추출물의 *Salmonella choleraesuis*에 대한 사멸효과는 0.01~3 mg/mL의 처리 농도에서는 그 효과를 나타내지 않았다(Fig. 4).

***Erwinia rhapontici*의 사멸효과** – 0.01~2 mg/mL로 처리 농도가 높아짐에 따라 2 log 정도로 대조군보다 생균수가 감소하는 생육저해효과를 보이다가 추출물의 처리농도가 3 mg/mL에 이르러서는 대조군과 비교했을 때 균체의 생육을 관찰할 수 없었다(Fig. 4).

***Vibrio parahaemolyticus*의 사멸효과** – 프로폴리스 추출물의 *Vibrio parahaemolyticus*에서의 사멸효과는 크게 관찰할 수 없었고 3 mg/mL의 농도로 추출물을 처리했을 때 1 log 정도의 생균수의 감소효과를 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

프로폴리스에 대한 미생물의 성장저해효과는 미생물의 생육에 영향을 미치는 각종 효소의 활성을 억제하여 이로 인해 미생물의 생육이 억제되어 항균활성이 나타내어지게 된다. 이로 인한 프로폴리스의 그램양성세균들에 대한 항균효과가 그램음성균들에 대한 항균효과보다 우수하다고 보고하는 다른 논문[16,19]들과 비교하여 볼 때 본 연구에서도 *Esherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella choleraesui*와 같은 그램 음성균들에 대한 항균효과가 그램 양성균들에 대한 효과보다 적은 것으로 나타났다. 프로폴리스 내의 성분은 산지나 채집시기 등에 따라서 크게 달라지는데 외국산 프로폴리스의 항균활성과 비교하여 볼 때 국내산 프로폴리스의 항균효과는 항균력의 차이가 크게 없거나 다소 우수하다고 판단된다. 따라서 프로폴리스 내의 항균활성을 나타내는 물질들에 대한 규명과 적용대상 식품에 대한 구체적인 연구 등이 병행된다면 천연보존제로서 상품화 가능성은 충분하다고 여겨진다.

국문요약

기존에 식품의 저장성 향상을 위해 사용되어졌던 방법들의 문제점들을 최소화하고 보다 효과적인 식품저장을 위해 전통적으로 식용되어 왔으며 그 안전성이 확보된 프로폴리스를 대상으로 대표적인 식품 부패 미생물에 대한 생육억제활성을 탐색하고 건강 지향적인 식품보존제로서 이를 식품에 적용하여 보다 좋은 품질의 가공식품개발에 활용코자 본 연구를 진행하였다. 프로폴리스 에탄올 추출물의 일반성분 분석 결과를 보면 19.41% 수분, 0.39% 조단백, 5.12% 조지방, 0.15% 조회분의 결과를 보여주었다. 프로폴리스는 에탄올 60%, 에탄올 80% 추출물에서 높은 추출율을 보였다. 프로폴리스 에탄올 추출물에 의한 항균성은 100% 에탄올 추출물로 실험한 처리구에서 높은 항균 효과를 나타내어 이를 사용하여 유해 미생물들에 대한 농도별 항균 효과를 살펴보았다. 프로폴리스 추출물로 유해미생물을 처리했을 때 *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*는 1~2 mg/mL로 처리 시 생균수가 1~4 log 감소하였고, *E. coli*는 3 mg/mL로 처리 시, *Bacillus cereus*는 1~2 mg/ml의 농도로 처리 시 대조군에 비해 생균수가 2 log 감소하였다. *Staphylococcus aureus*와 *Shigella sonnei*의 사멸효과는 0.1~3 mg/mL의 농도에서 생균수가 2~4 log 감소하였다. *Erwinia rhapontici*의 사멸효과는 2 mg/mL 농도로 실험했을 때 2 log 정도 생육저해효과를 보였고, *Salmonella choleraesuis*, *Vibrio parahaemolyticus*에서의 사멸효과는 크게 관찰할 수 없었다. 프로폴리스는 그램양성균에 대한 사멸효과가 그램음성균에 대한 효과 보다 더 우수하였다.

참고문헌

1. Fellows, P.J.: Food processing technology principle and practice. *Ellis horwood,* 221-247 (1988).
2. 김상순, 최홍식, 변광의: 식품가공저장학. 수학사, 서울, 16-19 (1993)
3. 신효선, 이서래: 최신식품화학, 신광출판사, 서울, 21-25 (1994).
4. Breidt, F. and Fleming, H.D.: Using lactic acid bacteria to improve the safety of minimally processed fruits and vegetables. *Food Tech,* **51**, 44-51 (1997).
5. Brock madigan, T.D., Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J.: Biology of microorganisms. *Prentice Hall. Ninth edition,* 150-177 (2000).
6. Watada, A.E., Kazuhiro, A. and Nauki, Y.: Physiological activities of partially processed fruits and vegetables. *Food. Tech,* 116-122 (1990).
7. Ronk, R.J., Carson, C.L. and Thomson, P.: Processing, packaging and regulation of minimally processed fruits and vegetables. *Food Tech,* 136-139 (1989).
8. Bremer, P.J., Simmonds, R.S. and Dufour M.: Development of a method to quantify in vitro the synergistic activity of

"natural" antimicrobials. Int. *J. Food Microbiol,* 249-258 (2003).
9. Sofos, J.N., Beuchat, L.R., Davison, P.M. and Johnson, E.A.: Naturally occurring antimicrobials in foods. *Regul. Toxicol,* **28**, 71-72 (1998).
10. Donadieu, Y.: Propolis in natural therapeutics. *Honey bee science,* **8**, 67-82 (1987).
11. 송효남: 아까시나무와 밤나무 유래 프로폴리스의 특성과 항산화 및 항균활성. 서울대학교 박사학위 논문, (1996).
12. Bankova, V., Christov, R., Popov, S., Marucci, M.C., Tsvetkova, I. and Kujumgiev, A.: Antibacterial activity of essential oils from brazilian propolis. *Fitoterapis,* **70**, 190-193 (1999).
13. 박형기: 천연항생물질 프로폴리스의 특성과 효용에 대한 고찰. *한국양봉학회지*, **9**, 168-177 (1994).
14. 박호용, 오현우, 박두상, 장영덕: 한국산 봉교추출물의 항생활성. *한국양봉학회지*, **10**, 53-56 (1995).
15. Cheng, P.C. and Wong, G.: Honey bee propolis: prospects in medicine. *Bee world,* **77**, 8-15 (1996).
16. Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R. and Popov, S.: Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J. Enthnopharm,* **64**, 235-240 (1999).
17. Steinberg, D., Kaine, G. and Gedalia, I.: Antibacterial effect of propolis and honey on oral bacteria. *Am. J. Dent.* **9**, 236-239 (1996).
18. 최혁재, 심상범, 김남재, 김종우: 프로폴리스 물 추출물의 약효연구. 응용약물학회지, **6**, 261-268 (1998).
19. Burdock, G.A.: Review of the Biological properties and toxicity of Bee propolis. *Food and chemical toxicol.* **36**, 347-363 (1998).
20. A.O.A.C. (1984) Official Methods of Analysis, 14th ed., Association ofAfficial Analytical Chemists, Washongton D.C.
21. 이수원, 황보식, 김희재: 국산 프로폴리스의 항균활성, *한국축산식품학회지*, **22**, 66-71 (2002).