

프로폴리스의 추출 및 항균활성 특성

김병문, 김정은, 송근호, 장화익¹, 이광래*
강원대학교 화학공학과; ¹강원도 중소기업청
(krlle@kangwon.ac.kr*)

Characteristics of extration and antibacterial activity from propolis

Byoung-Moon Kim, Jeong-Eun Kim, Kun-Ho Song, Wha-Ik Chang¹, Kwang-Rae Lee*
Dept. of Chemical Engineering, Kangwon National University;
¹Kangwon Regional Small and Medium Business Administration
(krlle@kangwon.ac.kr*)

서론

프로폴리스는 이미 B.C. 300년 전에 아프리카, 유럽지방을 중심으로 민간 의약으로 널리 사용되었던 천연 물질이었으나, 근세기에 들어 페니실린과 마이신등의 의약품이 발명되면서 많이 잊혀졌던 것이, 화학약품들의 독성과 부작용을 알게 되면서 다시 세계적으로 주목을 받고 있다. 이러한 프로폴리스의 주요 작용으로서는 항염증, 항균, 항산화, 국소마취, 항바이러스, 세포부활, 조직 재생작용 등이 있으며, 최근 제암 및 항암작용도 있는 것으로 연구, 발표되고 있다. 프로폴리스는 약 50% 이상이 왁스성분으로 구성되어 있는데 탄소가 수십 개 이상 단단히 결합된 구조를 가지고 있다. 이 결합조직에 유효성분인 플라보노이드류가 단단히 결합된 지용성 상태이기 때문에 온도조건과 용매조건이 맞지 않으면 추출이 쉽지 않다. 프로폴리스의 기존의 추출방법으로는 에탄올 추출법, 미셀화 추출법, 물 추출법, 초임계 추출법등이 있다. 특히, 에탄올 추출법은 가장 보편적으로 사용되고 있으며, 다른 방법에 비해 플라보노이드가 가장 많이 추출되는 방법으로 국제적으로 인정을 받아 가장 널리 사용되는 방법이다.

본 연구는 강원도 홍천지역의 프로폴리스 원피를 에탄올 추출법을 이용하여 추출 온도 및 시간, 용매의 총량, 용매의 비율을 변화시키면서 최적 추출조건을 실험적으로 구하였다. 또한, 추출 용매의 비율에 따른 항균특성을 조사하기 위해 Paper Disc Method 를 이용하여 추출된 프로폴리스의 성능을 실험하였다.

실험

1. 프로폴리스의 추출 및 플라보노이드 분석

강원도 홍천지방의 프로폴리스 원피를 망에서 털어낸후 육안으로 이물질을 제거하고 9mesh (2mm)의 체를 통해 거른 후 암소냉동 (-20℃) 보관 하여 사용하였다. 프로폴리스

분말 5g에 온도 (20, 40, 60, 80°C), 시간 (0.5, 1, 2, 4, 6, 12, 24h), 용매의 총량 (3, 5, 10, 15, 20배), 용매의 농도 (Water, 에탄올 50, 60, 70, 80, 90, 99.99%)를 달리하여 추출한 후 원심분리기 (3,000rpm, 10min, Brushless Dc motor centrifuge (Vslion, Us-5000n))로 분리하여 상등액을 취하고 냉장보관 (-20°C, 48h)한 후 여과지 (whatman No.2) 로 왁스를 제거하였다. 왁스가 제거된 프로폴리스 추출액을 진공 농축기를 이용하여 농축하고 처리방법은 Fig. 1.에 나타내었다. 본 실험에서 농축된 프로폴리스의 플라보노이드를 측정하기 위하여 UV Spectrophotometer (Hewlett packard, 8452A)를 이용하여 분석하였다. 플라보노이드를 분석은 Quercetin을 이용하여 각 농도에 (0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 mg/ml) 에탄올로 희석하여 조제하고, 흡광도를 구하고 얻은 검량선은 Fig. 2.에 나타내었다.

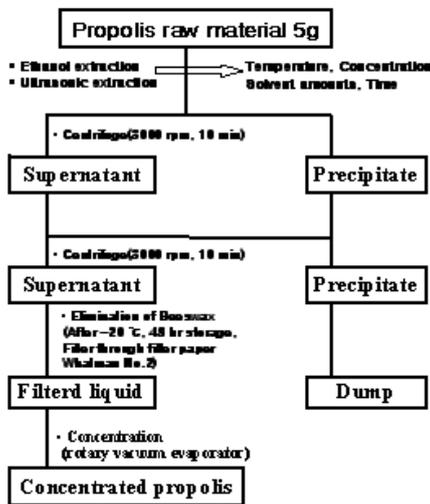


Fig. 1. Procedure for extraction of propolis

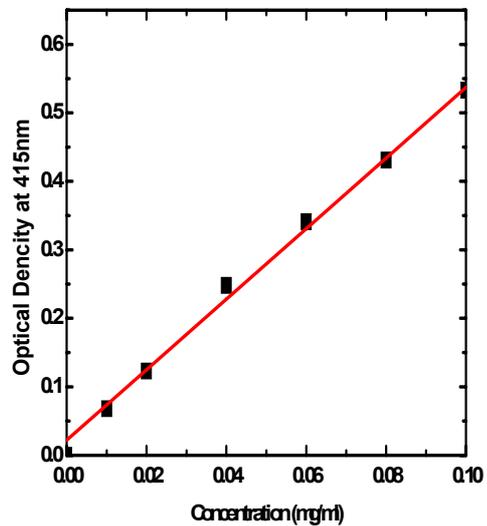


Fig. 2. Calibration curve of total flavonoid (quercetin)

2. 세균의 배양 및 항균활성

황색 포도상구균은 호기성 혹은 통성혐기성 그람양성 세균으로 사람의 피부나 점막에 집락을 형성하며 높은 보균율로 인하여 인체에 매우 흔한 감염증을 일으킨다.

세균은 MHA 사면배지에서 배양한 후 각 균주의 균총을 백금으로 취하여 100ml MHB에 접종하여 37°C에서 24시간 배양하여 활성화시키고 660nm에서 투과도가 10%가 되도록 MHB로 희석한 것을 시험용 균주로 사용하였다.

항균 활성 시험방법 중 Disc diffusion method 은 Petri dish에 MHA를 4mm 정도 부어서 굳힌 후 여기에 agar 및 각 시험용 균주를 각각 0.7%, 1%첨가한 한천배지에 4~5mm 두께로 도말하여 굳힌다. Paper dish (φ 8mm TOYO)에 추출된 분획물을 50μl 씩 흡수시킨 후 용매를 완전히 증발시킨 후 Petri dish에 밀착시킨 후 37°C에서 24시간 배양하여 균의 증식이 억제된 Clear zone을 조사하여 항균성을 측정하였다.

결과 및 토론

1. 프로폴리스의 최적 추출 조건

온도에 따른 프로폴리스의 추출 수율은 20℃에서 가장 큰 수율을 나타내었다. 온도가 증가함에 따라 왁스 성분의 추출량이 증가되어 나타난 결과로 판단된다. 또한, 프로폴리스 중에 함유된 플라보노이드를 기준으로 하였을 때 에탄올 추출 시 60℃에서 최적 추출 온도로 적합한 조건으로 나타났다.

추출 시간에 따른 추출물의 추출 수율, 플라보노이드 함량은 시간에 따라 증가된 양을 보이다가 일정 시간 이후 증가폭이 크게 감소되는 것으로 나타났다. 본 실험에서 최적 추출 시간은 6시간 동안 추출 하였을 경우 최대값을 나타내었다.

용매의 총량에 따른 추출물은 프로폴리스에 대한 에탄올의 비가 3배와 5배일 때는 용매의 양이 지나치게 적어 플라보노이드 성분이 충분히 추출되지 못하였으나, 20배로 증가하였을 때는 추출 수율, 플라보노이드 함량이 모두 최적조건으로 나타내었다.

프로폴리스를 물로 추출하였을 때는 플라보노이드 성분의 추출이 거의 이루어 지지 않고 수율도 매우 낮았다. 이는 프로폴리스에 함유되어 있는 플라보노이드가 난수용성이고 에탄올에 쉽게 용출되기 때문이며 결과적으로 프로폴리스의 물 추출은 적합하지 않는 것으로 판단된다. 실험에서 70% 농도의 에탄올에서 가장 높은 플라보노이드 함량을 나타내었고, 수율도 높게 유지되었다.

Table 1. Extration yield and total flavonoids of propolis by concentration

Concentration(%)	Water	50	60	70	80	90	99.99
Yield(%)	5.4	18.8	39.0	40.2	40.6	42.0	42.0
Total flavonoids(%)	0.99	7.64	8.68	9.36	9.14	8.96	8.72

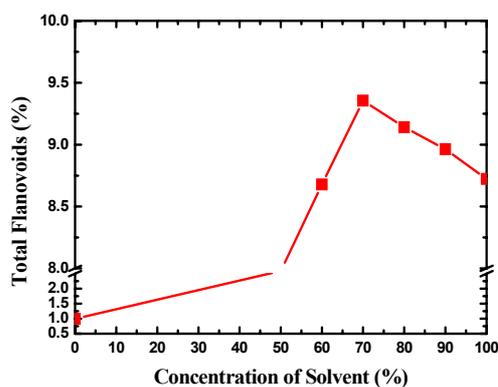


Fig. 3. Extration total flavonoids of propolis by concentration

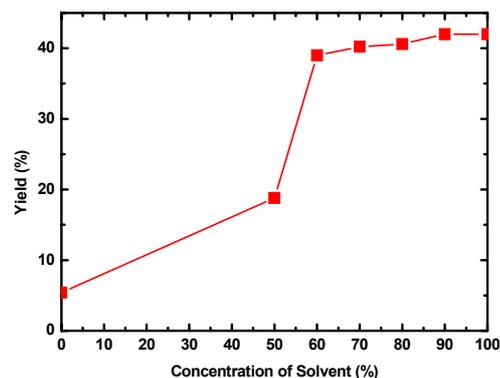


Fig. 4. Extration yield of propolis by concentration

2. 프로폴리스의 항균활성

황색 포도상구균에 대한 프로폴리스의 Disc diffusion method 에서 에탄올 추출물에 대한 항균 활성의 경우 50%에서 가장 높은 감수성을 나타내었고, 농도가 높아질수록 감수성이 감소하였다. 24h보다 48h동안 실험값이 감수성이 높게 나왔으며, 이는 시간이 지날수록 높은 항균활성을 가지고, 프로폴리스의 항균활성 지속성이 있음을 나타내었다. 한편, 물 (water) 추출물에 의한 경우에는 감수성을 나타내지 않았다.

Table 2. Antimicrobial activity of water and ethanolic extracts of propolis to staphylococcus aureus

Extracts of propolis	Zone of inhibition of microbial growth(mm)				
	24h	48h	24h		48h
water extract	8	8	80% ethanol	11.65	12
50% ethanol	13.2	13.25	90% ethanol	11.5	11.7
60% ethanol	12.6	13	99.99% ethanol	11.5	11.6
70% ethanol	12	12.7			

참고문헌

1. 김영언, Propolis로부터 유용성분의 분리, 정제 및 기능성 식품개발, 농림부(1998)
2. Lee, S. W., Kim, H. J., Hwang, B. S., "Studies on the chemical characteristics of Korean propolis", *Korean J. Food Sci.*, **21(4)**, 383-388(2001)
3. Kim, C. T., Kim, C. J., Cho, Y. J., Chio A. J., Sin, W. S., "Characteristics of propolis extrats from ethanol extration", *Korean J. Food Sci.*, **34(6)**, 941-946(2002)
4. Lu, L. C., Chen, Y. W., Chou, C. C., "Antibacterial activity of propolis staphylococcus aureus", *J. Food Microbiology* 102, (2005)213-220