

## 한국산과 미국산 프로폴리스의 항돌연변이 및 항균효과

장일웅 · 박정섭<sup>1</sup> · 권형철<sup>2</sup> · 정문웅<sup>3</sup> · 최동성<sup>4\*</sup>한국건강기능식품협회 한국기능식품연구원, <sup>1</sup>전북대학교 대학원 생물공정공학과<sup>2</sup>전북대학교 의학전문대학원 방사선종양학교실, <sup>3</sup>우석대학교 외식산업조리학과, <sup>4</sup>우석대학교 식품생명공학과

## Antimutagenic and Antibacterial Activities of Korean and American Propolis

Il-Woong Jang, Jeong-Seob Park<sup>1</sup>, Hyoung-Cheol Kwon<sup>2</sup>, Mun Yhung Jung<sup>3</sup>, and Dong-Seong Choi<sup>4\*</sup>

Korea Health Supplements Institute, Korea Health Supplements Association

<sup>1</sup>Department of Bioprocess Engineering, Graduate School, Chonbuk National University<sup>2</sup>Department of Radiation Oncology, Medical School, Chonbuk National University<sup>3</sup>Department of Restaurant Industry and Food Preparation, Woosuk University<sup>4</sup>Department of Food and Biotechnology, Woosuk University

**Abstract** The antimutagenic activities of ethanol extracts of Korean and American propolis were tested using *Salmonella* Typhimurium TA98 with two indirect mutagens of 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido [4,3-b]indole (Trp-P-1) and 2-aminoanthracene (2-AA) with S9 mix. Additionally, their antimicrobial activities against acne-related pathogenic strains of *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus Epidermidis*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* were evaluated using both paper disk method and agar dilution method. Ethanol extracts of Korean and American propolis showed strong inhibitory effects, in a dose dependant manner, against the mutagenicities induced by Trp-P-1 and 2-AA. The antimutagenic effect of ethanol extracts of Korean propolis showed significantly higher protective activity than that of American propolis against the Trp-P-1 induced mutagenicity of *S. Typhimurium* TA98 at the lower concentration (1-10 µg), but significantly lower protective activity at the higher concentration (50-200 µg). The antimutagenic effect of ethanol extract of Korean propolis showed significantly higher protective activity than that of American propolis against the 2-AA induced mutagenicity at the concentration of 1 µg, but significantly lower protective activity than that of the American at the higher concentration (50-200 µg). Both extracts showed strong antimicrobial activities against all the acne-related pathogens tested, with minimal inhibitory concentration (MIC) values in the range 1,500-5,000 µg/mL.

**Key words:** propolis, antimutagenic, indirect mutagen, antibacterial, acne

## 서 론

프로폴리스는 꿀벌이 식물로부터 수지물질을 채집하여 자신이 분비한 타액과 복부로부터 분비되는 왁스를 섞어 만드는 물질로서 수천년 전부터 의·과학 분야에서 건강관련 기능성물질로 사용되어 왔다(1). 프로폴리스는 방부, 항진균, 정균, 담습 분비촉진, 국소 수축, 경련 억제, 마취, 항염증, 항산화 효과 등 다양한 생리활성을 나타내고 각종 피부질환에 치료효과가 있으며(2), 의약품 및 화장품으로서 응용 가능성이 높은 유용한 물질로 주목을 받고 있다. 프로폴리스의 구성성분은 150-180여 개의 휘발성 물질과 페놀계 화합물로 주로 flavones, flavanones, flavonols과 같은 화합물인 것으로 밝혀져 있으며(3,4), Shigemi 등(5)은 프로폴리스로부터 7종의 p-coumaric acid 유도체, 4종의 flavonoids, 1종

의 prenylated phenolic acid, 4종의 diterpenic acid, 1종의 리그난, 2개의 p-coumaric acid ester, 5개의 cinnamic acid 유도체 등을 분리, 확인하였다.

프로폴리스는 3,2'-dimethyl-4-aminophenyl(DMAB), nitrovin, nitroguanidine, 4-nitro-O-phenylenediamine(4-NO), 1-nitropyrene(1-NP), 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline(IQ), benz[α]pyrene(B[a]P) 등에 의해 유도된 돌연변이에 대해 억제효과를 나타낸다(6-8). Ghisalberti(9)에 의하면 프로폴리스의 항균작용에 대한 체계적인 연구는 1948년 Kivalkina 등에 의해 *Staphylococcus aureus*에 대해 처음으로 시작되었다고 한다. Lindenfelser(10)는 미국산 15종의 프로폴리스로부터 얻은 알코올 추출물을 사용하여 항균작용을 조사하여 39종의 세균 중에서 *Bacillus barvae*에 가장 효과가 높았고 그람 양성구균과 내산성 간균을 포함한 25균주에 대하여 강한 항균 작용을 나타내는 것을 확인하였다. Takino와 Mochida(11)는 일본산 프로폴리스로부터 pinosylvin과 cinnamylideneacetic acid 등 2종의 항균물질을, Aga 등(12)은 브라질산 프로폴리스로부터 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid(DH), 3-prenyl-4-dihydrocinnaloxycinnamic acid, 2,2-dimethyl-6-carboxyethenyl-2H-1-benzopyran 등 3종의 항균물질을 분리 동정하였다.

국내에서 이루어진 프로폴리스의 항균활성에 대한 연구로는 Lee 등(13), Son(14), Lee 등(15), Hur 등(16), Park 등(17)의 보고

\*Corresponding author: Dong-Seong Choi, Department of Food and Biotechnology, Woosuk University, Samrye, Jeonbuk 565-701, Korea

Tel: 82-63-290-1430

Fax: 82-63-290-1429

E-mail: dschoi@woosuk.ac.kr

Received May 19, 2009; revised September 25, 2009;

accepted October 12, 2009

가 있으며, 이러한 항균활성은 프로폴리스의 생산지와 추출방법에 따라 항균효과가 다르게 나타나고 있다(1,18). 이러한 다양한 항돌연변이 및 항균 효과에 대한 연구가 이루어졌음에도 불구하고, 불고기 중의 대표적 heterocyclic amines의 하나로서 암을 유발하는 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido [4,3-b]indole(Trp-P-1)과 aromatic amine류의 하나로서 디젤 매연과 폴리우레탄 등에 포함되어 있는 발암물질인 2-aminoanthracene(2-AA)에 의해 유도된 돌연변이에 대한 프로폴리스의 항돌연변이 효과 및 대표적 여드름 관련 pathogenic 균주에 대한 프로폴리스의 항균활성에 관한 연구는 발표된 적이 없는 실정이다. 따라서 생산지가 다른 국내산과 미국산 프로폴리스의 Trp-P-1과 2-AA에 의해 유도된 돌연변이를 억제하는 능력 및 여드름과 관련된 병원성 미생물에 대한 억제활성을 측정하여 약간의 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

본 실험에 사용된 국산 프로폴리스는 전남 나주시에 소재한 가보농산(주) 제품을, 미국산 프로폴리스는 Stakichi사(Bloomfield Hills, MI, USA) 제품을 구입하여 사용하였으며, 4°C 냉장고에 보관하면서 시료로 사용하였다. 항균실험의 표준물질인 tetracycline과 azelaic acid는 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)의 제품을 구입하여 4°C에 보관하면서 사용하였다. 2-aminoanthracene(2-AA), 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole(Trp-P-1), dimethyl sulfoxide(DMSO), NADP,  $\beta$ -naphthoflavone은 Sigma-Aldrich사 제품을, brain heart infusion, tryptic soy broth, nutrient agar, bacto agar는 Difco사(Detroit, MI, USA) 제품을, Oxoid nutrient broth No. 2는 Oxoid사(Basingstoke, Hampshire, UK) 제품을, 기타 시약은 1급 이상의 제품을 사용하였다.

### 사용 균주 및 배지

프로폴리스의 항돌연변이원성 평가를 위한 *Salmonella* Typhimurium TA98(*hisC3052 rfa uvrB* +R pKM101, frame shift mutation)은 생명공학연구원 유전자은행에서 분양 받아 유전형질을 확인한 후 사용하였다. 항균활성 측정을 위한 여드름 관련 균주인 *Propionibacterium acnes* KCCM 41747, *Staphylococcus Epidermidis* KCCM 35494, *Pseudomonas aeruginosa* KCCM 11800은 한국종균협회에서, *Staphylococcus aureus* KCTC 1916은 한국생명공학연구원 유전자은행에서 분양 받아 사용하였고, 각 균주별 사용배지와 배양 조건은 Table 1과 같다. 균주는 각각의 배지에서 배양한 다음 20% 글리세롤과 1:1로 혼합, 급속 동결하여 -70°C에 보존하였으며, 보관 균주를 해당 배지에서 37°C, 24시간 배양하여 활성화시킨 후 실험에 사용하였다.

### 시료의 제조

일정량의 프로폴리스를 삼각플라스크에 넣고 10배량의 70% 에탄올을 첨가하여 40°C에서 12시간, 진탕 추출하고 No. 2 여과지로 여과하였다. 이 여과액을 감압 농축, 동결 건조하고 분말화한 다음, DMSO에 용해하여 실험용 시료로 사용하였다.

### S9 분획 제조

S9 분획의 조제는 Ong 등(19)에 따라 조제하였으며, 실험용 동물로는 200±10 g의 7주령 된 rat(male, Sprague Dawley, Daejeon Science Co., Daejeon, Korea)를, 유도물질로는 phenobarbital,  $\beta$ -naphthoflavone을 사용하였다. 조제된 S9 분획은 에펜돌프 튜브에

0.5 mL씩 분주하여 -70°C에 보관하면서 사용하였다. S9 mix는 Ames과 Maron의 방법(20)에 따라 조제하였다.

### 항돌연변이 시험

항돌연변이 실험은 Ames test를 개량한 preincubation 방법(20)으로 실시하였다. 미리 멸균시킨 시험관에 각 농도의 변이원 50  $\mu$ L, 0.5% S9 mix 0.5 mL, 각 농도의 프로폴리스 추출물 50  $\mu$ L, Oxoid nutrient broth No. 2에 하룻밤 배양시킨 *S. Typhimurium* TA98 배양액( $1.2 \times 10^9$  CFU/mL) 100  $\mu$ L를 혼합하고, 37°C에서 210 rpm으로 20분간 진탕 배양하였다. 배양액에 미리 준비해 둔 0.5 mM histidine과 biotin을 함유한 top agar 2 mL를 혼합한 후 minimal glucose agar plate[agar 15 g, 멸균수 930 mL, 50×VB salt 20 mL, 40% glucose 50 mL] 상에 도포, 평판 고화시킨 다음, 37°C에서 48시간 배양하여 발생한 복귀 돌연변이주(*his*<sup>+</sup> revertant colony)의 수를 계수하여 항돌연변이원성을 판정하였다. 항돌연변이 효과(억제율)는  $[M-S_1/(M-S_0) \times 100]$ 으로 계산하였고, 돌연변이원 만을 첨가하였을 때 복귀 돌연변이주의 수를 M, 자연 복귀 돌연변이주의 수를  $S_0$ , 돌연변이원과 시료를 첨가했을 때의 복귀 돌연변이주의 수를  $S_1$ 으로 나타내었다. 각각의 실험은 2반복 2 plate씩 실시하였다. 한편 Ames test에 사용한 *S. Typhimurium* TA98의 생육에 미치는 프로폴리스 추출물의 세포독성은 Jang 등의 방법(21)에 따라 수행하였다. 즉 *S. Typhimurium* TA98를 Oxoid nutrient broth No. 2(25 g/L)에 하룻밤 배양하고( $1.2 \times 10^9$  CFU/mL), 이 배양액을 1/15 sodium phosphate buffer(pH 7.2)로  $10^{-5}$ 배 희석하였다. 이 희석액 100  $\mu$ L, 0.1 M sodium phosphate buffer 0.55 mL(pH 7.2)와 각 농도별 프로폴리스 시료 50  $\mu$ L를 혼합하여 37°C에서 210 rpm으로 20분간 진탕 배양하였다. 이를 top agar[agar 6 g, NaCl 5 g per liter(45)] 2 mL를 첨가하여 혼합한 후, VBNM [agar 15 g, 증류수 920 mL, 50×VB salt 20 mL, 40% glucose 10 mL, Oxoid nutrient broth No. 2(25 g per liter) 50 mL] 평판배지 상에 도포하여 37°C에서 48시간 배양한 후 계수하여 세포독성을 나타내는 농도를 판정하였다.

### Paper disk법에 의한 antimicrobial activity 시험

프로폴리스의 항균효과는 National Committee for Clinical Laboratory Standards(NCCLS)의 지침(22)에 준하여 disk diffusion method로 측정하였다. 프로폴리스 시료를 DMSO에 용해하여 400 mg/mL 농도로 시료 원액을 조제하고 농도별 희석액을 제조하였다. Table 1의 배지 및 배양조건에서 배양한 각각의 공시균주 0.1 mL(최종 접종농도  $10^7$  CFU)를 도포한 agar plate 표면 위에 paper disk(diameter 6 mm, Watman No. 2)를 가볍게 올려놓고 25-5,000  $\mu$ g/mL의 농도로 조제한 시료액 25  $\mu$ L를 흡수시켰다. *P. acnes*는 혐기조건(5% CO<sub>2</sub>)에서 48시간, *S. Epidermidis* 및 *S. aureus*, *P. aeruginosa*는 12시간 37°C에서 배양한 후 생육 저지환(clear zone)의 크기를 analytical pakimeter(TESSA-CAL IP67, Bergdietikon, Switzerland)로 측정하였고, 각각의 실험은 2반복 2개 plate씩 실시하였다. 생육저지환의 크기는  $[W=(T-D)/2]$ 로 계산하였고, 생육

**Table 1. Media and culture conditions of tested microorganisms for antimicrobial activity**

Strains	Medium	Incubation condition
<i>P. acnes</i>	Brain Heart Infusion (BHI)	37°C, 5% CO <sub>2</sub> , 48 hr
<i>P. aeruginosa</i>	Nutrient broth	37°C, 200 rpm, 12 hr
<i>S. aureus</i>	Nutrient broth	37°C, 200 rpm, 12 hr
<i>S. Epidermidis</i>	Tryptic soy broth	37°C, 12 hr

저지환의 직경(mm)은 W, paper disk와 저지환의 전체 직경은 T, paper disk의 직경은 D로 나타내었다(23).

#### Minimal inhibitory concentration(MIC) 시험

프로폴리스의 최소저해농도(MIC)는 NCCLS의 지침(24)에 따라 agar dilution method로 평가하였다. 균주에 따른 각각의 배지 및 배양조건(Table 1)에서 배양한 각각의 공시균주 0.1 mL(최종 접종 농도  $1.3-1.8 \times 10^3$  CFU)를 각각의 고체배지 위에 옮기고 glass spreader를 사용하여 배지 상에 골고루 분포되도록 도포한 다음, 각각의 온도에서 12-48 hr 배양하여 균수를 계측하였다. 고체배지는 각각의 배지 19 mL와 DMSO에 최종 농도가 25-5,000  $\mu\text{g/mL}$ 가 되도록 조제한 국내산, 미국산 프로폴리스 1 mL를 혼합하여 제조하였다. MIC는 일정시간 배양 후 미생물의 생육을 관찰할 수 없는 프로폴리스의 최소 농도로 정하였고, 시험 미생물의 생육을 50% 저해하는 최소 농도를  $\text{MIC}_{50}$ 으로 하였다. 표준물질로 azelaic acid와 tetracycline을 사용하였다. 각 실험은 2반복 2 plate씩 실시하였다.

#### 통계분석

한국산과 미국산의 프로폴리스 비교는 SPSS program의 t-test에 의해 실시하였으며,  $p < 0.05$  수준에서 검정하였다.

### 결과 및 고찰

#### 항돌연변이 효과

Ames test에 있어서 공시 균주의 균수 감소는 돌연변이 억제 효과로 오인될 수 있어 균주의 생육을 억제하지 않는 농도에서 실험하는 것이 매우 중요하다. 항균력을 나타내지 않는 농도를 구하기 위해 국내산과 미국산 프로폴리스의 70% 에탄올 추출물을 일정한 농도로 증가시켜 *S. Typhimurium* TA98에 대한 세포독성을 검토하였다. 국내산과 미국산 모두 250  $\mu\text{g/plate}$ 의 농도에서 생육억제를 나타내기 시작하였으므로 돌연변이 억제효과 실험은 세포독성을 나타내지 않는 200  $\mu\text{g/plate}$  농도 이하에서 실시하였다. 간접변이원인 Trp-P-1과 2-AA에 의해 돌연변이가 유발된 *S. Typhimurium* TA98에 대해서 프로폴리스의 항돌연변이 효과를 평가하였고, 결과는 Fig. 1, 2와 같다. Trp-P-1으로 유도된 돌연변이에 대해 프로폴리스의 농도를 assay당 1, 5, 10, 50, 100, 150, 200  $\mu\text{g}$ 으로 증가시켰을 경우, 국내산과 미국산이 각각 0.9-91.3%, 0.5-104.2%의 용량 의존적 돌연변이 억제효과를 나타냈으며, 5-10  $\mu\text{g}$  농도에서는 국내산의 억제효과가 유의적으로 높았으나( $p < 0.05$ ), 50  $\mu\text{g}$  이상의 농도에서는 미국산 프로폴리스의 억제효과가 유의적으로 높았다( $p < 0.05$ ).

2-AA으로 유도된 돌연변이에 대해서도 국내산 37.6-94.4%, 미국산 21.0-97.7%의 용량 의존적 돌연변이 억제효과를 나타내었고, 1  $\mu\text{g}$  농도에서는 국내산의 억제효과가 37.6%로 미국산의 21.0%에 비하여 유의성 있게 높았으나, 50  $\mu\text{g}$  이상의 농도에서는 오히려 국내산보다 미국산의 억제효과가 유의적으로 높게 나타났다( $p < 0.05$ ). 국내산과 미국산 프로폴리스의 항돌연변이원성은 200  $\mu\text{g}$  농도에서 90% 이상의 매우 높은 억제효과를 나타내며, 농도가 높아질수록 미국산이 다소 강한 억제효과를 나타냄을 알 수 있었다. Rao 등(6)은 프로폴리스에 함유되어 있는 3종류의 caffeic acid ester가 *S. Typhimurium* TA98과 TA100에서 DMAB에 의해 유도된 돌연변이에 대해, Cizmarik와 Lahitova(7)는 프로폴리스 추출물이 *S. Typhimurium* TA97과 TA100에서 nitrovin과 nitroguanidine에 의해 유도된 돌연변이에 대해 억제효과를 나타낸다고 보고하

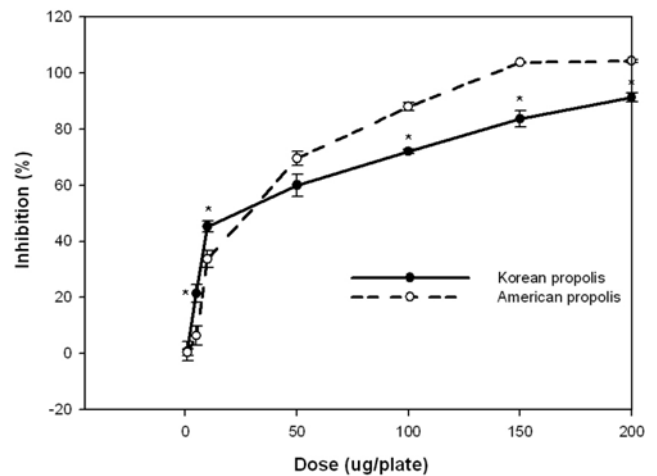


Fig. 1. Antimutagenic effect of ethanol extracts of Korean and American propolis on the mutagenicity of Trp-P-1 (0.5  $\mu\text{g/plate}$ ) in *S. Typhimurium* TA98. Values are mean $\pm$ SD. Values with \* are significantly different between the Korean and American propolis at  $p < 0.05$  as determined by t-test.

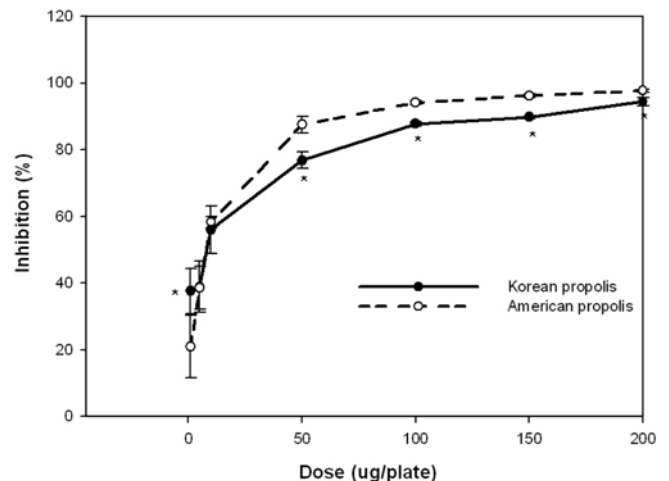


Fig. 2. Antimutagenic effect of ethanol extracts of Korean and American propolis on the mutagenicity of 2-AA (0.5  $\mu\text{g/plate}$ ) in *S. Typhimurium* TA98. Values are mean $\pm$ SD. Values with \* are significantly different between the Korean and American propolis at  $p < 0.05$  as determined by t-test.

였다. Jeng 등(8)은 *S. Typhimurium* TA98에 있어서 4-NO, 1-NP, IQ, B[a]P에 의해 유도된 돌연변이에 대한 브라질산 프로폴리스의 40% 에탄올 추출물의 돌연변이 억제효과를 조사하여 80  $\mu\text{g/plate}$  농도에서 4-NO에 대해 45%, 1-NP에 대해 22%, IQ에 대해 70%, 16  $\mu\text{g/plate}$  농도에서 B[a]P에 대해 79%의 억제효과를 나타내었다고 보고하였으며, 억제효과가 높았던 간접변이원인 IQ, B[a]P에 대한 프로폴리스 에탄올 추출물의 용량 의존적 항돌연변이 효과는 1) S9의 존재 하에서 cytochrome P450(CYP) 활성화의 저해, 2) 에탄올 추출물 중의 성분과 IQ, B[a]P의 proximate mutagen과의 대사 길항, 3) S9에 존재하는 CYP 1A1-linked ethoxyresorufin-O-deethylase와 1A2-linked 7-ethoxy-coumarin-O-deethylase 등 마이크로솜 효소의 불활성화 등에 기인한다고 주장하였다. 불고기 중의 대표적인 heterocyclic amine인 Trp-P-1은 CYP 1A에 의해(25), 디젤 매연과 폴리우레탄 등에 포함되어 있는 aromatic amine인 2-AA는 CYP 1A2에 의해(26) 활성화되고

**Table 2. Inhibitory effect (clear zone diameters in mm) of Korean and American propolis on the growth of pathogenic strains related to acne**

Dose ( $\mu\text{g}$ /paper disk)	Paper disk clear zone diameter (mm) <sup>1)</sup>							
	<i>P. acnes</i>		<i>S. Epidermidis</i>		<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	Kor <sup>2)</sup>	Am <sup>3)</sup>	Kor	Am	Kor	Am	Kor	Am
5,000	5.7 $\pm$ 0.4 <sup>4)</sup>	5.7 $\pm$ 0.2	5.9 $\pm$ 0.4	6.2 $\pm$ 0.5	6.8 $\pm$ 0.5	6.7 $\pm$ 0.2	5.2 $\pm$ 0.8	5.9 $\pm$ 0.5
2,500	4.9 $\pm$ 0.4	5.2 $\pm$ 0.3	5.5 $\pm$ 0.1	5.9 $\pm$ 0.8	5.8 $\pm$ 0.2	5.9 $\pm$ 0.3	4.3 $\pm$ 0.3	5.3 $\pm$ 0.2
1,000	4.0 $\pm$ 0.7	4.8 $\pm$ 0.3	4.4 $\pm$ 0.5	5.2 $\pm$ 0.1	5.4 $\pm$ 0.3	4.8 $\pm$ 0.1	3.5 $\pm$ 0.2	4.7 $\pm$ 0.4
500	4.0 $\pm$ 0.3	4.7 $\pm$ 0.3	4.3 $\pm$ 0.3	5.0 $\pm$ 0.6	5.1 $\pm$ 0.4	3.7 $\pm$ 0.2	3.0 $\pm$ 0.3	3.5 $\pm$ 0.3
250	4.2 $\pm$ 0.8	4.7 $\pm$ 0.6	4.5 $\pm$ 0.7	4.7 $\pm$ 0.3	5.0 $\pm$ 0.4	3.5 $\pm$ 0.1	2.8 $\pm$ 0.5	3.0 $\pm$ 0.2
100	3.5 $\pm$ 0.8	3.3 $\pm$ 0.3	3.7 $\pm$ 0.2	2.8 $\pm$ 0.4	3.5 $\pm$ 0.4	3.0 $\pm$ 0.1	2.6 $\pm$ 0.1	1.9 $\pm$ 0.2
50	3.3 $\pm$ 0.9	2.6 $\pm$ 0.1	3.4 $\pm$ 0.6	2.0 $\pm$ 0.6	3.2 $\pm$ 0.1	2.6 $\pm$ 0.3	2.7 $\pm$ 0.6	1.9 $\pm$ 0.4
25	3.0 $\pm$ 0.9	1.2 $\pm$ 0.4	3.9 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.5	3.0 $\pm$ 0.3	2.3 $\pm$ 0.2	2.8 $\pm$ 0.7	2.0 $\pm$ 0.5

<sup>1)</sup>Paper discs (6 mm in diameter) were treated with 25  $\mu\text{L}$  of the anti-acne substance purified and inhibition zone was measured against various microorganisms after incubation for 72 hr. Clear zone diameter is  $W=(T-D)/2$  (W: the diameter of clear zone excepting paper disk, T: the diameter of including paper disk, D: the diameter of paper disk).

<sup>2)</sup>Kor: Korean propolis.

<sup>3)</sup>Am: American propolis.

<sup>4)</sup>Values are mean $\pm$ SD.

**Table 3. MICs determination of Korean propolis against pathogenic strains related to acne**

Dose ( $\mu\text{g}$ /paper disk)	Number of CFU							
	<i>P. acnes</i>		<i>S. Epidermidis</i>		<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	Kor <sup>1)</sup>	Am <sup>2)</sup>	Kor	Am	Kor	Am	Kor	Am
5,000	0	0	0	0	0	0	0	0
2,500	98 $\pm$ 19 <sup>3)</sup>	164 $\pm$ 56	0	0	0	0	0	0
1,500	273 $\pm$ 11	281 $\pm$ 13	0	0	0	0	0	0
1,000	365 $\pm$ 23	349 $\pm$ 27	168 $\pm$ 21*	277 $\pm$ 7	48 $\pm$ 12*	195 $\pm$ 47	34 $\pm$ 14	43 $\pm$ 16
500	636 $\pm$ 11	654 $\pm$ 29	213 $\pm$ 23*	428 $\pm$ 11	194 $\pm$ 23*	308 $\pm$ 10	146 $\pm$ 34	170 $\pm$ 18
250	<b>841<math>\pm</math>21<sup>4)</sup></b>	<b>891<math>\pm</math>37<sup>4)</sup></b>	479 $\pm$ 32*	<b>731<math>\pm</math>27<sup>4)</sup></b>	389 $\pm$ 32*	495 $\pm$ 12	321 $\pm$ 25*	463 $\pm$ 33
100	1108 $\pm$ 86	1146 $\pm$ 62	<b>718<math>\pm</math>29<sup>4)</sup></b>	820 $\pm$ 22	<b>658<math>\pm</math>29<sup>4)</sup></b>	<b>763<math>\pm</math>19<sup>4)</sup></b>	567 $\pm$ 77	536 $\pm$ 37
50	1300 $\pm$ 36	1300 $\pm$ 37	875 $\pm$ 35	879 $\pm$ 61	927 $\pm$ 35	919 $\pm$ 81	<b>780<math>\pm</math>56<sup>4)</sup></b>	<b>739<math>\pm</math>111<sup>4)</sup></b>
25	1508 $\pm$ 63	1598 $\pm$ 83	953 $\pm$ 23	959 $\pm$ 39	1306 $\pm$ 43*	1500 $\pm$ 82	1137 $\pm$ 53*	1255 $\pm$ 37
0	1666 $\pm$ 115		1413 $\pm$ 76		1462 $\pm$ 123		1600 $\pm$ 80	
50 (Azelaic acid)	568 $\pm$ 130		580 $\pm$ 70		633 $\pm$ 89		683 $\pm$ 59	
25 (Tetracycline)	719 $\pm$ 62		680 $\pm$ 115		596 $\pm$ 23		632 $\pm$ 76	

<sup>1)</sup>Kor: Korean propolis.

<sup>2)</sup>Am: American propolis.

<sup>3)</sup>Values are mean $\pm$ SD. Values with \* are significantly different between the Korean and American propolis at  $p<0.05$  as determined by t-test.

<sup>4)</sup>MIC<sub>50</sub> was the minimal concentration inhibiting about 50% of visible bacterial growth.

활성화된 Trp-P-1과 2-AA는 DNA와 공유결합하여 돌연변이를 일으킨다. *S. Typhimurium* TA98에서 간접변이원인 Trp-P-1과 2-AA에 의해 유도된 돌연변이에 대한 프로폴리스 에탄올 추출물의 억제효과는 S9에 존재하는 CYP의 활성 저해, 프로폴리스 성분과 Trp-P-1, 2-AA의 proximate mutagen과의 대사길항, 마이크로솜 효소의 불활성화 등에 기인하는 것으로 추측되어지나, 억제기구의 명확한 해명을 위해서는 더 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

#### 여드름 균주에 대한 항균활성 평가

여드름을 일으키는 공시 균주에 대한 국내산과 미국산 프로폴리스의 70% 에탄올 추출물의 항균활성을 paper disk법으로 평가한 결과는 Table 2와 같다. *P. acnes*, *S. Epidermidis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*에 대해 항균활성을 나타내기 시작한 농도는 국내산과 미국산 프로폴리스 모두 25  $\mu\text{g}$ /paper disk이었고, 5,000  $\mu\text{g}$ /paper

disk 농도에서 생육 저지환의 크기는 각각 국내산 5.7, 5.9, 6.8, 5.2 mm, 미국산 5.7, 6.2, 6.7, 5.9 mm이었다. *S. aureus*에 대한 가장 강한 항균활성을 나타내었으며, 국내산과 미국산은 유사한 항균활성 정도를 나타내었다. Lee 등(15)은 경남 거창에서 채취한 프로폴리스의 70% 에탄올 추출물의 5.0 mg/paper disk 농도에 있어서 *S. aureus*와 *P. aeruginosa*에 대한 clear zone 직경은 각각 14, 11 mm라고 보고하였는데 clear zone의 반경 크기를 측정한 저자들의 연구 결과와 비교했을 때 거의 같은 정도의 항균활성을 나타냈음을 알 수 있었다.

#### 프로폴리스의 최소저해 농도

프로폴리스 70% 에탄올 추출물의 공시 균주에 대한 최소저해 농도(MIC)를 측정된 결과는 Table 3과 같다. 공시 균주의 50% 생육 저해활성을 나타내는 MIC<sub>50</sub>은 국내산의 경우 *P. acnes*에 대해 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , *S. Epidermidis*, *S. aureus*에 대해 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , *P.*

*aeruginosa*에 대해 50 µg/mL로 나타났고, 미국산의 경우 *P. acnes*, *S. Epidermidis*에 대해 250 µg/mL, *S. aureus*에 대해 100 µg/mL, *P. aeruginosa*에 대해 50 µg/mL로 나타났다. 미생물의 생육이 관찰되지 않는 MIC 농도는 국내산과 미국산 모두 *P. acnes*는 5,000 µg/mL 그리고, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*들은 1,500 µg/mL 농도로 나타내었다. 국내산과 미국산 프로폴리스의 여드름 균주에 대한 항균효과(MIC)를 표준물질인 azelaic acid(50 µg/mL), tetracycline(25 µg/mL)과 비교하였을 때 프로폴리스의 70% 에탄올 추출물이 정제되지 않은 상태임을 고려하면 여드름 균주에 대해 강한 항균효과를 나타냈음을 알 수가 있다. 한편 국내산과 미국산 프로폴리스에 대한 최소저해농도의 유의성을 알아보기 위하여 T-test를 실시한 결과 *S. epidermidis*와 *S. aureus*에서는 대체적으로 한국산이 미국산보다 강한 항균효과를 나타내었으며 ( $p < 0.05$ ), *P. acnes*와 *P. aeruginosa*에 대해서는 유의성을 나타내지 않았다( $p > 0.05$ ). Lee 등(13)은 경북 예천과 영월산 프로폴리스의 100% 에탄올 추출물의 MIC 농도가 *S. aureus*에 대해 각각 0.25, 0.25 mg, *P. aeruginosa*에 대해 각각 0.20, 0.15 mg/mL라고 보고하였는데, 저자들의 연구에서 얻어진 결과와는 6-10배의 차이가 있었다. 이러한 차이는 에탄올 추출 농도의 차이에서 기인할 수도 있으나 Park과 Ikegaki(18)는 60-80% 에탄올 추출 농도에서 항균활성이 가장 높고 항균활성을 나타내는 flavonoid의 함량도 가장 많으며, 90% 이상의 에탄올 농도에서는 오히려 항균활성과 flavonoid 함량 모두 감소한다고 보고한 바 있다. 프로폴리스의 항균성물질로 Takino 등(11)은 pinosylvin과 cinnamylidene acetic acid를 분리 동정하였고, Aga 등(12)은 브라질산 프로폴리스로부터 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid(DH), 3-prenyl-4-dihydrocinnaoxyxinnamic acid, 2,2-dimethyl-6-carboxyethenyl-2H-1-benzopyran 등 3종의 항균물질을 분리 동정하고 *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Arthroderma benhamiae*에 대한 DH의 MIC는 각각 15.6, 31.3, 15.6 µg/mL이었다고 보고하였다. Metzner 등(27)은 galangin, pinocembrin, pinobanksin 등의 flavonoid가 *Bacillus* sp., *S. aureus*, *Candida* sp. 등에 대해 항균효과를 나타낸다고 보고하였으며, Park과 Ikegaki(18)는 프로폴리스를 60-80% 에탄올로 추출했을 때 pinocembrin의 함량이 가장 높았다고 보고한 바 있다.

본 연구의 결과 프로폴리스는 항돌연변이 활성을 나타내면서 여드름 형성 원인균에 대해 생육 억제효과를 나타내어 암 예방 건강기능식품의 소재, 여드름 개선용 미용식품 및 화장품의 소재나 치료제로서의 사용 가능성이 높은 것으로 판단되었다.

## 요 약

프로폴리스 에탄올 추출물의 항돌연변이 및 항균효과를 시험하여 국내산과 미국산 프로폴리스의 생리활성을 평가하였다. 항돌연변이 활성은 Ames test로, 항균활성은 여드름 형성에 관여하는 미생물인 *P. acnes*, *S. Epidermidis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*에 대한 생육 억제효과를 paper disk 법과 agar dilution 법으로 평가하였다. *S. Typhimurium* TA98 균주에 있어서 1-200 µg/plate 농도로 70% 에탄올 추출물을 첨가했을 때 Trp-p-1에 의해 유도된 돌연변이에 대해 국내산 0.9-91.3%, 미국산 0.5-104.2%, 2-AA에 의해 유도된 돌연변이에 대해서는 국내산 37.6-94.4%, 미국산 21.0-97.7%의 돌연변이 억제효과를 용량 의존적으로 각각 나타내었다. 항균활성을 paper disk 법으로 평가했을 때 *P. acnes*, *S. Epidermidis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*에 대해 70% 에탄올 추출물의 5,000 µg/paper disk 농도에서의 생육 저지환의 크기는 국내산이

각각 5.7, 5.9, 6.8, 5.2 mm, 미국산이 각각 5.7, 6.2, 6.7, 5.9 mm 이었다. Agar dilution 법으로 평가한 MIC는 *P. acnes*, *P. aeruginosa*, *S. Epidermidis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*에 대해 국내산, 미국산 모두 5,000, 1,500, 1,500, 1,500 µg/mL로 나타났다.

## 감사의 글

이 논문은 2009학년도 우석대학교 교내 학술연구비 지원에 의하여 연구되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

## 문 헌

1. Wollenweber E, Hausen BM, Greenway W. Phenolic constituents and sensitizing properties of propolis, poplar balsam, and balsam of Peru. Bull. Groupe Polyphenols 15: 112-120 (1990)
2. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). Food Chem. Toxicol. 36: 347-363 (1998)
3. Walker P, Crane E. Constituents of propolis. Apodologie 18: 327-334 (1987)
4. Greenaway W, May J, Scaysbrook T, Whatley FR. Identification by gas chromatography-mass spectrometry of 150 compounds in propolis. Z. fur Naturforsch. 46c: 111-121 (1990)
5. Shigemi T, Tsutomu W, Tanaka N. Studies on the constituents of Brazilian propolis. Chem. Pharm. Bull. 47: 1388-1392 (1999)
6. Rao CV, Desai D, Kaul B, Amin S, Reddy BS. Effects of caffeic acid esters on carcinogen-induced mutagenicity and human adenocarcinoma cell growth. Chem. -Biol. Interact. 84: 277-290 (1992)
7. Cizmarik J, Lahitova N. Antimutagenicity of propolis. Pharmazie 53: 883-884 (1998)
8. Jeng SN, Shih MK, Kao CM, Liu TZ, Chen SC. Antimutagenicity of ethanol extracts of bee glue against environmental mutagens. Food Chem. Toxicol. 38: 893-897 (2000)
9. Ghisalberti EL. Propolis: A review. Bee World 60: 59-84 (1979)
10. Lindenfelser LA. Antimicrobial activity of propolis. Am. Bee J. 107: 90-92 (1967)
11. Takino Y, Mochida S. Propolis its chemical constituents and biological activities. Honeybee Sci. 3: 145-1449 (1982)
12. Aga H, Shibuya T, Sugimoto T, Kurimoto M, Nakajima S. Isolation and Identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. Biosci. Biotech. Bioch. 58: 945-946 (1994)
13. Lee SW, Hwangbo S, Kim HJ. Antimicrobial activities of Korean propolis. Korean J. Food Sci. Anim. Resour. 22: 66-71 (2002)
14. Son YR. Studies of the antimicrobial effect of extracts of propolis. J. Food Hyg. Saf. 18: 189-194 (2003)
15. Lee HJ, Bae YI, Jeong CH, Shim KH. Biological activities of various solvent extracts from propolis. Korean J. Food Nutr. 34: 1-7 (2005)
16. Hur YK, Kim NR, Yoon WK, Jo SK, Jung UH, Park HR. Properties of Korean propolis on the antibacterial activity and inhibition of antibiotic-resistant bacteria. Korean J. Apic. 22: 71-78 (2007)
17. Park HK, Kim SM, Shim CH. Antimicrobial activity of water soluble propolis. Korean J. Food Nutr. 21: 15-21 (2008)
18. Park YK, Ikegaki M. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. Biosci. Biotech. Bioch. 62: 2230-2232 (1998)
19. Ong TM, Mukhtar M, Wolf CR, Zeiger E. Different effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver. J. Environ. Pathol. Tox. Oncol. 4: 55-60 (1980)
20. Ames BN, Maron DM. Revised methods for the *S. typhimurium* mutagenicity test. Mutat. Res. 113: 173-215 (1983)
21. Jang, GH, Ahn, BY, Kwon, YJ, Choi, DS. Antimutagenic effect of resveratrol on Trp P-1 in *Salmonella typhimurium* TA98. Korean J. Food Nutr. 14: 329-332 (2001)
22. NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test. 6<sup>th</sup> ed. Approved standard, NCCLS document M2-A6,

- National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, USA (1997)
23. Kwak HS, Nam CH, Kwon HS. A study on the essential oil for hair health care. Korean Public Health Res. 31: 27-36 (2005)
24. NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacterial that Grow Aerobically. 3<sup>th</sup> ed. Approved standard, NCCLS document M7-A3, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Vilanova, PA, USA (1993)
25. Hashimoto Y, Shudo K, Okamoto T. Activation of a mutagen, 3-amino-1-methyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole. Identification of 3-hydroxyamino-1-methyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole and its reaction with DNA. Biochem. Bioph. Res. Co. 96: 355-362 (1980)
26. Carrière V, de Waziers I, Courtois YA, Leroux JP, Beaune PH. Cytochrome P450 induction and mutagenicity of 2-aminoanthracene(2AA) in rat liver and gut. Mutat. Res. 268: 11-20 (1992)
27. Metzner J, Bekemeier H, Paintz M, Schneidewind E. On the antimicrobial activity of propolis and propolis constituents. Pharmazie 34: 97-102 (1979)