

수용성 Propolis를 이용한 식육의 기능성 증진

한 승 관

(동신대학교 생물자원산업화지원센터)

수용성 Propolis를 이용한 식육의 기능성 증진

한 승 관

동신대학교 생물자원산업화지원센터

I. 서 론

생체방어, 신체리듬의 조절 등에 관계되는 기능을 생체에 대해 충분히 발현할 수 있도록 설계된 일 상적으로 섭취 가능한 식품인 기능성식품이 상품화되고 있다. 이것은 국민들의 건강에 대한 관심이 꾸준히 증가함에 따라 건강 지향적인 식품의 개발 및 판매가 활발히 진행되고 있기 때문이다. 최근, 일 본에서는 3차 기능성분을 함유한 식품소재와 물성 등의 품질개선 기능을 갖는 식품소재를 포함한 품 질개선 기능을 식품의 4차 기능으로 제안하고 있다(早千幸男, 1994).

축산식품에는 인체 기능의 정상적 유지 및 발달에 필수적인 영양소가 다량 함유되어 있어 중요한 식품소재로 인식되어 인간의 주요 식품자원으로 매우 유용하게 사용되어 왔다. 최근에는 뇌졸중, 고 혈압, 동맥경화 등 심혈관 질환이나 성인병의 위험인자로 알려진 콜레스테롤, 포화지방의 함량이 축 산식품에 많다는 이유로 일부 계층에서는 이를 기피하는 경향을 보이고 있다. 그러나 소비자들의 건 강 지향적 사고로 다양하면서도 차별화된 고급 축산물에 대한 구매경향은 높아지고 있다. 따라서, 육 제품 소비의 촉진뿐만 아니라 질병의 예방, 건강을 증진시키고 치료에 효과적인 고부가가치 기능성 고급 축산물의 개발은 필연적인 것으로 생각된다.

II. 발효 천연물 propolis의 기능성

고대 이집트에서는 영생불멸을 믿고 죽은 사람을 미라로 만들 때 propolis의 방부력을 이용하였음이 오늘날 증명되었다. Propolis는 벌이 소나무, 전나무, 버드나무, 포플라 등 여러 가지 수목 및 꽃에서 수 액을 모아 뒷다리에 붙여 벌통으로 모아오면 다른 꿀벌들이 수액을 씹어서 벌의 타액 속 효소와 반응 하여 생긴 물질이다. 이렇게 하여 생성된 propolis를 벌들은 벌집의 입구, 빈틈 등을 매워 바이러스나 박테리아, 세균 등 유해 미생물의 침입을 방어하는 용도로 사용하였다. Propolis의 성분을 보면, 플라 보노이드가 다량 함유되어 있으며 그밖에 지방, 아미노산, 유기산, 미네랄, 비타민 등 90여 종류의 영 양소가 들어 있다. 주요 작용으로는 항균(Chisalberti, 1979; Takino and Mochida, 1982; Cueller et al., 1990; Matsuno, 1992; Ikeno et al, 1994; Takaisi-kikuni and Schilcher, 1994), 항암(Chiao et al., 1995)과 항산

화 효과(Takahama et al., 1984; Erben-Russ et al., 1987; Rojas and Cuetara, 1990; Han and Park, 2002)등이 있다. 또한 propolis는 세포의 구성에 중요한 역할을 수행하고 있다(Bevilacqua et al., 1997). 그 중 중요한 성분으로는 플라보노이드, 피노셉브린, 크리신, 갈랑인 등을 들 수 있다(Siess et al., 1996). 이와 같이, Propolis는 꿀벌이 식용식물자원의 기능성 성분을 이용하여 생산하는 천연물질로서 그 다양한 기능성 효능으로 주목받고 있는 물질이다. 약리적 임상실험을 통하여 진통작용, 항염증작용 물질로, 제압효과가 뚜렷한 물질로, 면역력 향상 효과를 가진 물질로, 강한 살균력을 가진 물질 등으로 입증되었으며, 기타 전신세포의 활성화, 호르몬 자극작용, 비타민 P의 작용으로 괴혈병치료, 고혈압에는 혈압강하작용, 저혈압에는 혈압상승작용, 생체호르몬의 균형유지에 효과가 뚜렷함이 증명되었다. 이러한 propolis를 식육 및 식품에 이용한 연구는 많이 수행되지 않았으나, 한과 박(1996, 2002)은 돈육을 이용하여 propolis의 항산화 효과를 인정하는 연구보고를 하였다. 그러나 아직도 기능성 생리활성 물질인 propolis를 식품의 저장 및 가공에 이용하는 연구가 미비한 실정이다.

표 1. Propolis의 기능성 효과

신체부위	Propolis가 적용되는 질환	신체부위	Propolis가 적용되는 질환
머리	뇌신경의 피로, 스트레스, 만성두통, 뇌종양	대사기관	간장, 신장, 대장질환, 치질, 만성변비
안면	눈의 피로, 기타 눈 질환, 자율신경 실조, 비염, 축농증, 중이염	부인병	자궁근종, 자궁내막염, 생리불순, 생리통, 방광염, 암자궁염증
호흡기	천식, 결핵, 편도선염, 폐기종, 감기 폐암, 치아노제, 인후통	피부	피부대사 기능저하, 간질환, 알레르기, 아토피성 피부염, 사마귀, 티눈, 무좀
소화기	치근염, 치통, 치농류, 위염, 식도암, 위궤양, 위암, 폴립, 궤양성 대장염, 과민성대장염, 스트레스성 위염	순환계	심장계 질환, 각종 신경질환, 피로, 백혈병, 암, 악성임파종, 저혈압
내장	감염, 간경화, 지방간, 간암, 당뇨병, 담석증	골관절	류마티스 관절염, 골수암, 통풍, 척추염, 골수염
신경	스트레스, 자율신경, 실조증, 갑상선, 신경과민, 히스테리, 우울증, 갱년기 장애	근육	류마티스 근육통, 어깨결림, 근육무력증, 요통, 각종 교원병

Ⅲ. 유용성분 및 분석

Propolis에는 플라보노이드 식물 염색체군 및 각종 아미노산, 비타민군, 효소, 미네랄군, 단백질군 등 현재 80여종 이상의 유용 성분이 포함되어 있는 것으로 밝혀져 있다. 또한, 그 각각의 성분이 어떠한 생리활성 효과를 가지고 있는지에 대하여도 현재의 과학 기술로 해명되어 가고 있는 추세이다.

성분분석내용

45~50% 수지류, 방향성 발삼유

25~30% 밀랍, 정유 등의 유성성분

5~10% 화분

5~10% 꽃가루 외 유기산, 에틸유, 유지, 아미노산, 철분, 동분, 망간, 아연, 피톤치드(Fitontsidy) 비타민 B₁, B₂, B₃, 비타민 E, 프로비타민 A, 플라보노이드, 갈랑인, 피노셉브린, 효소, 항균물질

* 용점 - 62.5℃

* 비중 - 1.127

플라보노이드

현재, propolis의 구체적인 성분에 대해서는 아직 확인되지 않은 물질이 많은 것으로 알려지고 있다. 그러나 propolis가 함유하고 있는 미세 성분의 구체적인 성상·효과와 카페인산 펜에틸 에스테르(CAPE; Caffeic acid phenethyl ester), artemillin C, 게르세틴 등 중요한 유용성을 가진 성분에 대한 연구가 지속적으로 진행되고 있다. 카곤·올론·플라본·ISO 플라본·네오 플라본·플라바논·플라바노르케르세틴 등 다수가 있으며, 그 외 수목으로부터 채취된 것 이외의 독자적인 플라보노이드도 존재한다.

플라보노이드는 식물의 향기와 색소에 함유된 물질로서 건강유지 및 증진에 우수함을 가진 성분으로 propolis 성분의 핵심부분에 해당한다. 단, propolis가 함유하고 있는 다양한 플라보노이드 성분은 꿀벌의 타액 및 효소와의 결합, 독자적인 숙성과정을 거친 것이다. 따라서 식물에 존재하는 플라보노이드와는 상당히 다른 성격과 유용성을 지니고 있다는 특징이 있다.

아미노산/미네랄

화분·유기산·아미노산·셀룰로오스·플라보익스모노사카라이드, 그 외 에테르 미량 미네랄(철·아연·규소·칼슘·알루미늄·망간·코발트·마그네슘 등) 등이 있다.

비타민

프로비타민 A·비타민 B₂·D·E·P·니코틴산엽산 등의 플라보노이드의 역할은 자외선의 해로부터 식물을 지키는 것이다. 일광은 식물이 생육하기 위해서 없어서는 안 되는 것이지만 대량으로 자외선을 쬐면 활성산소가 발생하고 식물의 세포에 상처가 나게 된다. 이것은 식물에게 있어 생사에 관련된 문제로 그 해를 최소한으로 줄여준다.

인체에 미치는 영향

플라보노이드의 약효를 함유하여 인체의 면역효과를 증진시키고, 안정성이 입증되어 인체에 무해한 기능성 함유 제재로 건강증진에 효과적이다.

IV. 수용성 Propolis의 제조

중탕 수용성 propolis(Water Extracted Propolis, WEP) 및 고순도 WEP 제조

Propolis를 고체 상태로 분말화 하였으며, 그 중 시료 2g(1×1 mm²)을 1:100의 비율(w/v)로 d.w. 200ml에 용해하였다. 용해한 것을 shaking water bath(Jeio Tech : BS-21)를 이용하여 70~95℃에서 60rpm으로 18~24시간 동안 교반 추출하였다. 추출물은 whatman filter No. 5로 여과하여 순수한 정제액(WEP)을 얻었다. 국내산 WEP(GBWEP)와 sigma사 WEP(SWEP)로 구분하여 실험에 이용하였다. 그 외 고순도 수용성 propolis를 새롭게 제조하였다.

V. WEP 및 식육의 기능성 평가

세포독성실험

항암제의 세포 독성실험과 화학요법 감작제의 스크리닝 방법은 살아있는 세포의 미토콘드리아 효소가 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]를 환원시켜 formazan을 형성시킬 수 있음을 근거로 formazan의 농도를 측정함으로써 생존한 세포수를 측정하는 Twentyman과 Luscombe¹⁵)의 MTT 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 96 well microplate (Falcon)에 약물을 10 µl씩 넣고 3~4일간 약물 없이 배양한 내성 세포주를 2×10⁴ ~ 10⁵/ml가 되도록 한 세포부유액 90 µl씩을 각각 넣었다. 이때 약물대신 PBS를 넣어 세포의 대조군으로 삼고, 세포 대신 배양액만을 넣어 blank로 삼았다. 그 후 CO₂ 배양기내에서 3~4일간 배양하여 모든 well에 MTT 용액(5mg/ml PBS, Sigma) 10 µl를 가해주고 다시 37℃, 5% CO₂에서 4~5시간 더 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 각 well에 생성된 formazan 결정을 0.04 N HCl-isopropanol 용액 100 µl 또는 DMSO (dimethylsulfoxide, Sigma) 150 µl로 잘 녹여서 microplate reader (Bio-Tek, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

항균 활성

Propolis 수용성 추출물(WEP)의 항균 활성을 검색하기 위해서 Gram양성의 세균(*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*)과 Gram음성(*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*)의 세균에 대해 항균 활성을 경시적으로 측정하였다.

항진균 활성

Propolis 수용성 추출물의 항진균 활성을 검색하기 위해서 *Trichosporon beigeli*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* 세균에 대해 항진균 활성을 경시적으로 측정하였다.

유지산화안정도 측정

유지산화안정도 실험은 Rancimat (743 Metrohm, Switzerland)를 이용하여 reaction vessel에 lard를 3.0g 취한 후, 120℃에서 시간당 20L의 여과된 공기를 주입하여 산화시켰다. 이때 발생하는 휘발성 산화 생성물을 60mL의 증류수가 들어 있는 absorption vessel에 이행시켜 전기전도도의 변화에 따라 자동적으로 산출된 유도기간으로 항산화 정도를 측정하였다(Laubli and Brutel, 1986). 항산화력의 비교는

추출물을 첨가하지 않은 유지시료를 대조구로 하여 산출한 Antioxidative Index(AI)로써 표시하였다.

$$AI(\text{Antioxidative Index}) = \frac{\text{항산화제 첨가구의 유도기간}}{\text{무첨가구의 유도기간}}$$

TBA(Thiobarbituric acid)가 측정

Witte 등(1970)의 방법에 의해 돈육 10g을 homogenizer에서 20% TCA용액 25ml를 첨가하여 2분간 14,000 rpm으로 균질화하였다. 이 현탁액을 100ml volumetric flask에 mass-up시켜 Whatman No.1 filter paper로 여과하였다. 여과액 5ml를 취해서 2-TBA시약(0.005M, in water) 5ml와 혼합하여 실온 냉암소에서 15시간 동안 방치한 후, UV-VIS Spectrophotometer(UV 1650, Shimadzu, Tokyo, Japan)로 530nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 TBA가를 계산하였으며 계산방법은 아래와 같다.

$$TBA(\text{MDA}_{\text{mg}} / 1000\text{g}) = \text{흡광도} \times 5.2$$

GC (Shimadzu GC-17AATF) 분석

Headspace autosampler SPB 7000을 이용하여 propolis의 비점에 따른 구성성분을 분석하였다.

Table 1. GC headspace conditions for analysis of propolis

GC	GC-17AATF Headspace Autosampler SPB 50
Column	SUPELCO WAX™-10 (30m×0.25mm i.d., 0.25µm film thickness)
Detector	FID
Carrier gas	Helium(1.0ml/min)
Make up gas	N ₂ (30ml/min)
Detector temp.	200 °C
Injector temp.	150 °C
Split ratio	1 : 10
Injection volume	1 µl

통계분석

모든 결과는 3반복 실험의 평균±표준편차로 나타냈으며, 각 군간의 유의성은 T-test(Statistical Analysis Software, SAS institute)로 검정하였다.

VI. 고순도 WEP의 기능성 검증

1. 고순도 WEP의 세포독성효과

발효천연물인 propolis를 새로운 방법으로 제조한 수용성 propolis가 유방암, 백혈병 및 폐암에 미치는 독성효과를 조사하였다. 국내산 propolis와 증류수를 1:10(w/w)의 비율로 혼합한 후, 특정방법으로 수용성 propolis를 제조하였다. 제조한 수용성 propolis의 항암효과를 알아보기 위해 유방암, 백혈병 및 폐암 등의 세포주들을 이용하여 *in vitro* 상태에서 세포독성효과를 조사하였다. 4일 동안 배양한 유방암 MCF-7, 백혈병 AML-2/WT 및 폐암 Calu-6 등의 세포주들을 각각 2×10^4 /ml, 2×10^5 /ml 및 2×10^4 /ml가 되도록 한 세포부유액 90 μ 씩을 넣고 사용하였다. 그 결과, IC(생존율) 50을 최적농도로 보았을 때 수용성 propolis(WEP)의 항암효과는 백혈병>폐암>유방암 순으로 나타났다. 유방암이 340 μ g/ml, 폐암이 250 μ g/ml의 농도를 투여하였을 때 IC₅₀에 도달하였다. 특히, 백혈병은 수용성 propolis 100 μ g/ml를 투여하였을 때 IC₃₀의 우수한 독성효과를 나타냈다.

2. 항균 활성

Propolis 0.5~5mg 상당의 수용성 추출물에서 Gram양성의 세균(*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*)과 Gram음성(*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*)의 세균에 대해 증식억제능을 나타냈다.

3. 항진균 활성

Propolis 0.25mg의 수용성 추출물에서 *Trichosporon beigellii*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* 세균에 대해 진균 증식억제능을 나타냈다.

Ⅶ. 식육(중탕 propolis 첨가육)의 기능성 검증

1. 중탕 propolis 첨가육의 항산화 효과

가보농산의 WEP(GBWEP)와 EEP(GBEEP)를 실온에서 추출한 것과 증탕으로 처리하여 추출한 것의 항산화 효과를 비교 실험하였다. Propolis를 각각의 용매로 추출한 것들은 대조구보다 유의적으로 AI가 길게 나타나 항산화 효과를 보였다. Han과 Park(2002)은 실온에서 추출한 WEP, EEP와 DREEP가 돈육 sausage에서 항산화 효과가 있음을 보고하였다. WEP를 새롭게 증탕 처리하여 추출한 것이 실온에서 추출한 것보다 항산화 효과가 유의적으로 우수하였다. 또한, 각각의 시료를 70~95℃에서 증탕 처리하여 추출한 것과 실온에서 추출한 것을 비교한 결과, EEP는 실온에서 추출하고 WEP는 증탕에서 추출하였을 때가 더욱 강한 항산화 효과를 나타냈다. Takahama 등(1984)은 플라보노이드 함량이 높아짐에 따라 지질의 유효기간이 조금 연장되는 경향을 보인다고 보고하였다. 이와같은 결과를 통해 EEP가 증탕처리 함으로써 에탄올에 녹는 성분들의 일부가 증발되었기 때문에 실온에서 추출한 EEP가 유지산화 안정도가 더욱 길었던 것으로 생각된다. WEP를 실온에서 추출한 것보다 증탕처리 한 것의 유지산화 안정도가 길었던 것은 증탕 처리함으로써 생리활성 성분이 활성화 된 것으로 생각된다.

2. 국산과 Sigma사 propolis 첨가육의 항산화 효과

국산 propolis(GBWEP)와 외국산 propolis(SWEP)와의 항산화 효과에 대한 비교실험을 하였다. 증탕

처리한 SWEP와 GBWEP를 ascorbic acid와 함께 항산화 효과에 대한 실험을 실시한 결과, 대조구에 비해 모든 처리구의 AI가 높게 나타나 유의적으로 항산화 효과가 있음을 나타냈다. 그 중에서 GBWEP는 AI가 3.69로 가장 높게 나타났다. 즉, SWEP의 2.69 보다도 월등히 높았으며, ascorbic acid의 3.08 보다도 높은 AI를 나타내 천연 항산화제로서의 가능성을 시사했다. 이것은 국내산 propolis를 추출한 GBWEP가 Sigma사 propolis인 SWEP보다 월등히 우수한 항산화 효과가 있음을 의미한다. 이러한 결과는 식물성 유지에 대한 propolis의 항산화 효과에서 국내산이 브라질산과 호주산에 비해 더 좋은 효과가 있었다는 보고(김 등, 2002)와 일치하였다.

3. 증탕처리 propolis의 항산화 효과 원인 규명

GBWEP를 증탕 처리한 것이 실온에서 추출한 것보다 강한 항산화 효과를 나타낸 것에 대한 원인을 규명하고자 하였다. GBWEP의 비점에 따른 구성성분을 GC headspace를 이용하여 실험한 결과, Retention time (RT) 3~10분과 18~23분 사이에서 저비점과 고비점 물질로 크게 분류된 것을 볼 수 있었다. 특히 100℃이하와 150℃이상에서 많은 피크들이 분포되어 있었다. 이것은 propolis의 구성성분들이 100℃이하에서와 150℃이상에서 주로 추출되는 것을 의미한다고 생각된다. 따라서 일정한 온도인 70~95℃로 propolis를 증탕 처리하여 증탕 WEP를 조제함으로써 저비점 물질들이 추출되어 실온에서 추출한 WEP보다 더욱 강한 항산화 효과를 나타낸 것으로 생각된다.

VIII. 결 론

기능성식품은 지속적이고 급진적으로 발전할 생명공학기술이 접목되어 산업적으로 매우 중요한 분야로 발전될 것으로 예상된다. 특히, 우리나라의 경우 한의학, 천연물 이용 자료와 소재 등이 오랜 동안 광범위하게 축적되어 기능성식품 소재로 다방면으로 활용할 수 있다. “기능성”이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 말한다. 기능성 시험의 범위는 *in vitro*, *in vivo*, 인체적용시험 등이며, *in vivo* 시험에서 기능성과 인체적용 시험시 필요한 용량 설정 근거와 안전성을 확인해야 한다. 따라서 본 연구는 기본적인 자료이므로 앞으로도 기능성 시험을 통한 필요한 용량 설정 및 안전성을 제시할 것이다. 이러한 과정을 통해 향후 다양한 수용성 propolis의 제조기술 확립 및 이를 이용한 식육 및 식육제품의 기능성 증진은 가능하리라 생각한다.

참고문헌

- 김희재, 황보 식, 이수원. 2002. 국산propolis의 항산화 효과에 관한 연구. 한국축산식품학회지. 22(1): 77-80.
- 부千幸男. 1994(3). 月刊Foodchemical, 40p.
- Bevilacqua, M., Bevilacqua, M., Serra, E., Vianello, A., Garrou, E., Sparagna, B., Barale, U. and Zaccagna, C. A. 1997. Natural resin association such as incense and propolis in zootechnology. Agric Eco. Environ.

62: 247-252.

- Chiao, C., Carothers, A. M., Grunberger, D., Solomon, G., Preston, A. and Barrett, J. C. 1995. Apoptosis and altered redox state induced by caffeic acid phenethyl ester in transformed rat fibroblast cells. *Cancer Res.* 55: 3576-3579.
- Chisalberti, E. L. 1979. Propolis: A review. *Bee World.* 60: 59-63.
- Cuellar, C. A., Rojas Hernandez, N. M. and Martinez Perez, J. 1990. New antimicrobial structure from propolis collected in Cuba. *Revta-Cubana-de-Farmacía.* 24: 51-54.
- Erben-russ, M., Bors, W. and Saran, M. 1987. Reactions of linoleic and peroxy radicals with phenolic antioxidants: a pulse radiolysis study. *Int. J. Radiat. Biol.* 52: 393-397.
- Han, S. K. and Park, H. K. 1996. A Study on the Preservation of Meat Products with Water Extracted Propolis(WEP). *Korean J. Ani Sci.* 38: 605-612.
- Han, S. K. and Park, H. K. 2002. Accumulation of thiobarbituric acid-reactive substances in cured pork sausages treated with propolis extracts. *J. Sci. Food Agric.* 82: 1487-1489.
- Ikeno, K., Ikeno, T. and Miyazawa, T. 1994. Effects of propolis on dental caries in rats. *Honeybee Sci.* 15: 1-6.
- Laubli, M. W. and Brutel, P. A. 1986. Determination of the oxidative stability of fats and oils; Comparison between the active oxygen method(AOCS Cd 12-57) and the rancimat method. *JAOCS.* 63: 792-796.
- Matsuno, T. 1992. Isolation and characterization of the tumoricidal substances from Brazilian propolis. *Honeybee Sci.* 13: 49-53.
- Rojas hernandez, N. M. and de la, K. Cuétara Bernal. 1990. Antibiotic effect of propolis against strains of *Staphylococcus aureus* of human clinical origin. *Revta-Cubana-de-Farmacía.* 24: 45-48.
- Siess, M. H., Lebon, A. M., Canivenclavier, M. C., Amiot, M. J., Sabatier, S., Aubert, S. Y. and Suschetet, M. 1996. Flavonoids of honey and propolis-characterization and effects on hepatic drug-metabolizing enzymes and benzo(A) pyrene-DNA binding in rats. *J. Agric. Food Chem.* 44: 2297-2301.
- Takahama, U., Youngman, R. J. and Elstner, E. F. 1984. Transformation of quercetin by singlet oxygen generated by photosensitized reaction. *Photobiochem. and Photobiophysics.* 7:175-179
- Takaisi-kikuni, N. B. and Schilcher, H. 1994. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined-propolis provenance. *Planta Medica.* 60: 222-226.
- Takino, Y. and Mochida, S. 1982. Propolis, its chemical constituents and biological activities. *Honeybee Sci.* 3: 145-149.
- Witte, V. C., Krause, G. F. and Bailey, M. E. 1970. A new extraction method for determining 2-thiobarbituric acid values of pork and beef during storage. *J. Food Sci.* 35: 582-587.