

프로폴리스 용매별 추출물의 생리활성

이호재¹ · 배영일² · 정창호³ · 심기환^{3*}

¹남해군 농업기술센터

²진주산업대학교 식품과학과

³경상대학교 대학원 응용생명과학부 · 농업생명과학연구원

Biological Activities of Various Solvent Extracts from Propolis

Ho Jae Lee¹, Young Il Bae², Chang Ho Jeong³ and Ki Hwan Shim^{3*}

¹Namhaegun Agricultural Technology Center, Gyeongnam 668-812, Korea

²Dept. of Food Science and Technology, Jinju National University, Jinju 660-758, Korea

³Division of Applied Life Science, Graduate School and Institute of Agricultural Life Sciences, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

Abstract

The scavenging effects of four extracts on the DPPH radical were increased with increasing amount of extract. However, these effects were not statistically significant. The reducing power of the extracts is increased as the amount of extract is increased. To compare reducing powers of various solvent extracts, 50% ethanol extract showed the highest reducing power. The various solvent extracts were also capable of scavenging nitrite in a manner dependent on concentration. They exhibited scavenging effects 90% on nitrite at the dose 500 µg of water extract from propolis. The propolis extract significantly inhibited all the microorganisms tested, showing the largest inhibitory zone for *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*. The 70% ethanol extract from propolis exhibited the strongest inhibitory effect on A549. The inhibitory effect of four extracts showed in that order 70% ethanol extract > 95% ethanol extract > water extract > 50% ethanol extract.

Key words: propolis, DPPH radical, reducing power, nitrite, microorganisms, A549

서 론

벌집에서 얻어지는 지용성 복합체인 프로폴리스는 꿀, 잎, 봉오리 등으로부터 수집하는 wax와 수지(resin)물질을 꿀벌들이 모아 벌 자신의 침샘 분비물과 혼합하여 만드는 수지성, 점착성, 고무상의 물질로 고대 시대 이후의 사람들에게 민간의약품으로 잘 알려져 있지만 최근에는 의약품 및 화장품에도 응용가능성이 높은 매우 유용한 물질로 주목받고 있다(1,2). 프로폴리스에는 다양한 화학성분 즉, polyphenols (flavonoid aglycones, phenolic acid와 esters, phenolic aldehyde, alcohols 및 ketones), sesquiterpene, quinones, coumarins, steroids, amino acid 및 inorganic compound와 같은 160가지 이상의 성분이 함유되어 있으며, 식물의 종과 지역적으로 매우 그 종류가 다양하다고 보고되어 있다(3,4). 또한 프로폴리스의 생리활성에 대하여 많은 연구가 이미 진행되어 항암, 항균, 항박테리아, 항바이러스, 항염증, 항진균성, 항산화 및 알레르기성 피부염 치료에도 매우 높은 활성을 나타내었다. 이와 같이 프로폴리스가 다양한 생리활성을

가지는 주된 이유는 cinnamic acid와 caffeic acids ester를 비롯한 많은 종류의 플라보노이드에 의한 것으로 입증되었다. 프로폴리스에는 유용한 성분들이 다량 함유되어 있어 일찍부터 동북부유럽 및 남미 등지에서는 오래 전부터 프로폴리스의 성분과 작용 등을 밝히려는 노력이 계속 진행되고 있었고, 국내에서도 프로폴리스에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(5-10).

또한 식품에 직접 적용한 연구로 Lim 등(11)은 프로폴리스 추출물의 유지산화 억제효과, Han과 Park(12,13)은 프로폴리스 에탄올 추출물을 육제품 단백질의 변화에 미치는 효과, 육제품의 지방산화에 미치는 효과, Kim 등(14)은 프로폴리스의 첨가가 식빵의 저장수명과 노화에 미치는 영향, Yang 등(15)은 프로폴리스 처리가 마른 오징어의 품질에 미치는 영향 등이 있다.

따라서 본 연구에서는 프로폴리스 추출물을 이용하여 기능성 제품 및 건강식품 자원으로 이용하고, 우리나라에서 생산되는 프로폴리스 각종 추출물의 생리활성을 조사하여 고부가가치 및 건강지향성 가공식품 개발의 기초자료로 활

*Corresponding author. E-mail: khshim@nongae.gsnu.ac.kr
Phone: 82-55-751-5479, Fax: 82-55-753-4630

용하고자 프로폴리스를 각종 용매로 추출한 후 항산화, 아질산염 소거효과, 항균 및 항암활성을 조사하였다.

재료 및 방법

시료의 추출 및 조제

프로폴리스는 2002년 10월 경남 거창 일원에서 채취한 것으로 냉동보관하면서 실험에 사용하였으며, 용매별 추출은 각 시료 100 g을 물, 50% ethanol, 70% ethanol 및 95% ethanol 등 4종류의 용매로 환류 냉각장치를 이용 40°C, 70°C 및 90°C에서 3시간씩 3회 반복 추출하였다. 추출물의 왁스성분을 제거하기 위하여 -20°C에서 48시간 냉동 보관한 다음 24시간 마다 3회 반복 여과(Whatman No. 2)하여 매회 여과한 여액을 혼합하고 rotary vacuum evaporator(EYELA, N-N series, Japan)로 50°C이하의 온도에서 완전 농축한 후 건조된 시료를 에탄올 및 증류수에 녹여 냉장보관하면서 각종 실험 시료로 사용하였다.

DPPH radical 소거 활성

시료를 1 mL의 에탄올에 희석시킨 용액과 에탄올로서 1.5×10^{-4} M/mL 농도가 되게한 DPPH(Sigma, 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl)용액 4 mL씩을 vortex로 균일하게 혼합한 다음 실온에서 30분간 방치한 후 UV-spectrophotometer (Shimadzu UV-1601, Japan)를 이용하여 517 nm에서 흡광도(optical density, O.D.)를 측정하였다(16).

Reducing power

Yen과 Chen의 방법(17)에 따라 시료 2.5 mL에 sodium phosphate buffer(2.5 mL, 200 mM, pH 6.6)와 1% potassium ferricyanide(2.5 mL)를 혼합시킨 후 혼합물을 50°C에서 20분 동안 incubation시킨 다음 trichloroacetic acid(2.5 mL, 10%, w/v)를 첨가하여 650×g에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리한 상층액(5 mL)에 탈이온수(5 mL)와 1% ferric chloride 1 mL를 첨가시킨 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

식용유지에 대한 항산화 효과

본 연구에서는 대두유(H 주식회사)를 기질로 사용하여 시료 100 g에 propolis 추출물을 1,000 mg 농도로 첨가하고, 100 mg의 BHT를 첨가한 시료를 positive control로 하여 60°C 항온기에 저장하면서 경시적으로 일정량씩 공전삼각 플라스크에 평취하여 분석하였다. 즉, 시료에 chloroform 10 mL, acetic acid 15 mL 및 KI 포화용액 1 mL를 가하여 1분간 진탕시켜 5분간 암소에 방치시킨 후 증류수를 75 mL 첨가하여 진탕시킨 다음 1% 전분용액을 지시약으로 0.01 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 용액을 이용하여 POV값(peroxide value)을 측정하였다. TBA는 유지 일정량에 benzene 10 mL를 혼합하여 용해시킨 후 TBA(2-thiobarbituric acid) 혼합액 10 mL를 가하고 가끔 흔들며 주면서 4분간 방치한다. 이 액을 분액깔때기에 옮기고 정치하여 2개의 층으로 분리시킨 다음 아래층을 분

리하여 screw cap tube에 회수한 후 끓는 물에서 30분간 가열 후 냉각하고 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 산가는 유지시료 5 g을 취해 ethylether와 ethanol 혼합액(1:2, v/v) 100 mL를 가한 다음 완전히 용해시킨 후, 페놀프탈레인을 지시약으로 0.1 N KOH ethanol 표준용액으로 적정하여 산출하였다(18).

아질산염 소거 활성

아질산염 소거 활성측정은 Gray와 Dugan의 방법(19)에 따라 1 mM NaNO_2 용액 1 mL에 시료를 농도별로 첨가하고, 여기에 0.1 N HCl 및 0.2 M 구연산 완충용액을 사용하여 반응용액의 pH를 1.2로 조절하여 반응용액의 최종 부피를 10 mL로 하였다. 이 용액을 37°C에서 1시간 반응시킨 후 각 반응용액을 1 mL씩 취하여 2% 초산용액 5 mL, Griess 시약 0.4 mL를 가하여 잘 혼합한 다음 실온에서 15분간 방치시킨 후 UV-spectrophotometer를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

항균실험

프로폴리스 용매별 추출물의 항균효과는 paper disc 방법(20)을 이용하여 측정하였다. 즉, 프로폴리스 용매별 추출물을 에탄올 및 증류수에 녹여 0.22 μm membrane filter로 여과하여 제균하고 멸균된 paper disc에 일정량씩 흡수시킨 후 용매를 완전히 증발시킨 후 시험용 평판배지 표면에 놓아 밀착시키고 냉장고(4°C)에서 1시간 동안 방치한 다음 각 균주의 배양조건에 따라 24~48시간 동안 배양한 다음 paper disc 주위의 clear zone 및 inhibition zone의 직경(mm)을 측정하여 항균력을 조사하였다.

폐암 세포주에 대한 *in vitro* 세포독성

본 실험에 사용된 인체암 세포주는 A549(lung carcinoma)를 사용하였으며, 10% FCS가 포함된 RPMI 1640배지(Gibco Cat. No. 31800; with L-glutamine, without NaHCO_3)를 사용하여 37°C, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 부착된 세포를 배양병의 표면에서 떼어내고 무균상태하에서 각 well에 희석된 세포를 50 μL 씩 가하고 동일조건의 배양기에서 24시간 배양시켜 세포를 well plate에 부착시켰다. 여기에 시료를 주입하고, 다시 세포를 well표면에 부착시키기 위하여 48시간 배양시키고, 1% acetic acid로 세척하고 건조시켰다. 건조된 well은 SRB법에 따라 0.4% sulforhodamine B를 100 μL /well을 가하여 단백질을 염색시켰다. 30분 방치한 다음 0.1% acetic acid로 세척 후 다시 건조시키고 10 mM Tris base (pH 10.5)를 100 μL /well에 가하여 염색시약을 용해시키고 분광광도계 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(21).

결과 및 고찰

DPPH radical 소거 활성

프로폴리스 추출물을 농도별로 조제하여 DPPH radical

소거 활성을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. DPPH radical 소거 활성은 전반적으로 프로폴리스 추출물의 첨가 농도가 상승함에 따라 증가하여 추출물 12 µg을 첨가했을 때 30% 이하의 DPPH radical 소거 활성을 보였으며, 100 µg 첨가구는 약 60~90%로 시료에 따라 DPPH radical 소거 활성은 서로 다르게 나타내었다. 또한 추출물중에서 낮은 농도에서는 70% 에탄올 추출물에서 높은 활성을 나타내었으며, 농도가 증가하면서 95% 에탄올 추출물이 가장 높은 활성을 나타내었고, 낮은 농도에서는 프로폴리스 추출물이 오히려 BHA 보다 높은 활성을 나타내었으나 농도가 높아짐에 따라 프로폴리스보다 높은 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다. Banskota 등(22)은 여러 가지 프로폴리스 물추출물과 메탄올 추출물의 DPPH radical 소거활성을 측정하고 브라질과 중국산 프로폴리스 물추출물이 메탄올 추출물보다 강한 DPPH radical 소거활성을 나타내었으며, 페루와 네덜란드산 프로폴리스의 경우에는 물보다 메탄올 추출물에서 높은 활성을 나타내었다고 보고하여 생산지나 추출용매에 따라 항산화력의 차이를 나타내는 것을 확인하였다.

Reducing power

추출물의 농도를 각각 달리하여 첨가한 후 금속이온을 환원시키는 환원력을 측정하고 결과는 Fig. 2와 같다. 환원력에서의 흡광도 수치는 그 자체가 시료의 환원력을 나타내며, 높은 환원력을 가지는 물질은 흡광도의 수치가 높게 나타났다. 프로폴리스 용매별 추출물의 첨가농도가 점차적으로 증가함에 따라 비례적으로 환원력이 증가하는 경향을 나타내었으며, 특히 50% 에탄올에서 추출한 시료에서 가장 강한 환원력을 나타내었고, 95% 에탄올, 물 및 70% 에탄올 추출물 순으로 환원력을 나타내었다.

식용유지에 대한 항산화 효과

프로폴리스를 각종 용매로 추출한 후 각 추출물을 유지에

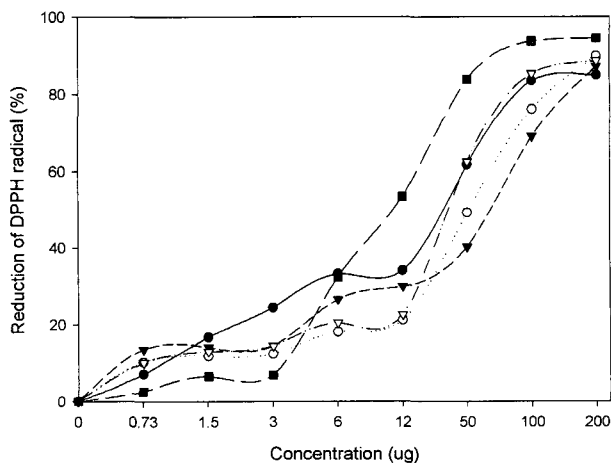


Fig. 1. DPPH radical scavenging effect of various solvent extracts from propolis. ●: Water ext., ○: 50% EtOH ext., ▼: 70% EtOH ext., ▽: 95% EtOH ext., ■: BHA.

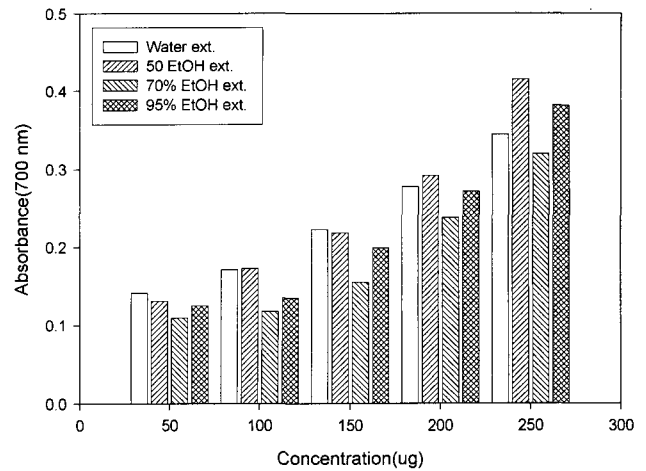


Fig. 2. Reducing power of various solvent extracts from propolis.

1,000 mg씩 첨가하여 60°C에서 저장하면서 과산화물가, TBA가 및 산가를 측정하고 결과는 Fig. 3, 4 및 5와 같다. 즉, 대두유의 과산화물가는 저장초기에는 대조구와 시료 첨가구간의 차이는 뚜렷하게 나타나지 않았으나 8일째부터 프로폴리스 각 용매별 추출물을 첨가하지 않은 대조구는 32.73 meq/kg으로 이미 산패가 서서히 진행되는 것으로 나타난 반면 95% 에탄올 추출물의 경우 9.41 meq/kg으로 positive control로 사용한 BHT보다 낮은 수치를 나타내었다. 특히 저장 10일 이후부터는 프로폴리스 95% 에탄올 추출물 첨가구의 과산화물값이 10.69~18.94 meq/kg으로 나타나 저장 초기의 신선한 상태를 지속한 반면 대조구는 16일째 110.36 meq/kg을 나타냄으로서 프로폴리스의 첨가구가 대조구에 비하여 과산화물가의 증가가 현저히 느리게 진행되어 유지의 산패를 억제시키는 것으로 확인되었다. TBA가 변화에 미치는 영향을 측정하고 결과는 Fig. 4와 같다. 즉, 저장 4일까

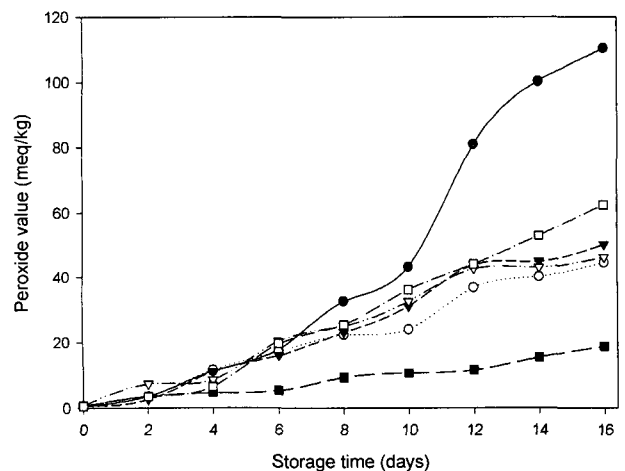


Fig. 3. Changes in peroxide value of the soybean oil with BHT and various solvent extracts from propolis during the storage at 60°C.

●: Control, ○: Water ext., ▼: 50% EtOH ext., ▽: 70% EtOH ext., ■: 95% EtOH ext., □: BHT.

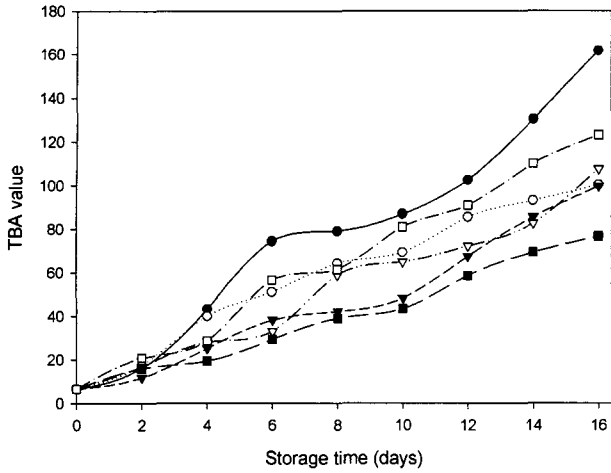


Fig. 4. Changes in TBA value of the soybean oil with BHT and various solvent extracts from propolis during the storage at 60°C.

●: Control, ○: Water ext., ▼: 50% EtOH ext., ▽: 70% EtOH ext., ■: 95% EtOH ext., □: BHT.

지 95% 에탄올 추출물 1,000 mg 첨가구의 TBA가 19.22를 나타낸 반면 프로폴리스 추출물을 첨가하지 않은 대조구의 경우는 43.12을 나타내었으며, 저장 10일째 대조구가 86.69인데 비하여 95% 에탄올 추출물 1,000 mg 첨가구는 43.20으로 나타나 프로폴리스 추출물의 첨가에 의해 약 2배의 TBA가의 증가폭이 감소되었다. 특히 BHT 100 mg을 첨가한 시료 80.87과 비교하여 볼 때 합성 항산화제로 많이 쓰이는 BHT보다 우수한 결과를 나타내었다. 산가는 유지분자들의 가수분해에 의해서 형성된 유리지방산 함량의 척도이며, 유리지방산은 자동산화물을 촉진하여 품질저하를 일으키는 원인이 되는 것으로 Fig. 5는 저장기간에 따른 프로폴리스 첨가구의 산가 변화를 살펴본 것으로서 저장 4일째 무첨가구가 약 0.39의 수치를 나타낸 반면 프로폴리스 추출물 첨가구는 4일까지 0.1이하의 수치를 지속한 후 그 뒤로 상승하여 저장 16일째 50%, 70%, 95% 에탄올, 물 추출물 및 BHT 첨가구의 경우 각각 1.28, 1.15, 0.92, 1.10 및 0.81로 나타나 프로폴리스의 각종 추출물이 유지의 산패를 억제시키는데 매우 효과가 높은 것으로 나타나 천연 항산화 물질로서의 이용 가능성이 매우 높다고 생각한다. Kim 등(23)은 식물성 유지에 대한 프로폴리스의 항산화 효과에서 중국산이 국내산과 거의 대등한 효과를 보였지만 브라질산과 호주산에 비해서는 더 좋은 효과가 있는 것으로 나타났으며, 이는 프로폴리스의 주성분인 플라보노이드 계통의 화합물에 의한 것으로 생각된다고 보고하여 본 실험의 결과와 유사한 경향을 나타내었다.

아질산염 소거 활성

프로폴리스 용매별 추출물의 아질산염 소거 활성을 측정한 결과는 Fig. 6과 같다. 50%와 70% 에탄올 추출물을 농도별로 첨가하였을 때는 80%수준의 아질산염 소거 활성을 나

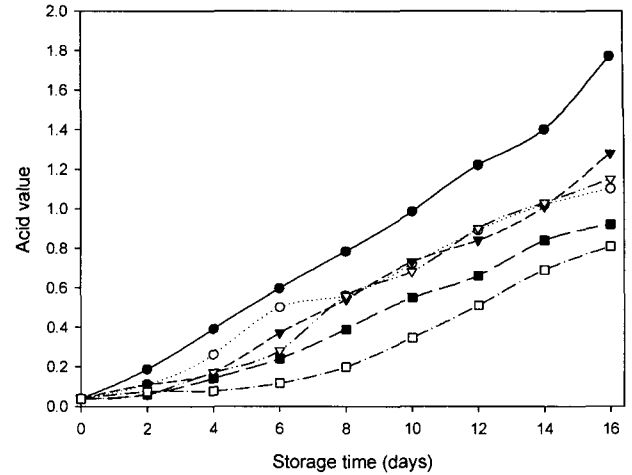


Fig. 5. Changes in acid value of the soybean oil with BHT and various solvent extracts from propolis during the storage at 60°C.

●: Control, ○: Water ext., ▼: 50% EtOH ext., ▽: 70% EtOH ext., ■: 95% EtOH ext., □: BHT.

타내어 큰 차이를 보이지 않았으나 pH에 의해 매우 큰 차이를 나타내었다. 95% 에탄올 추출물도 농도에는 큰 차이를 나타내지 않았지만 pH에 의한 영향을 많이 받는 것으로 나타난 반면 물 추출물의 경우에는 추출물의 농도가 증가함에 따라 아질산염 소거 활성도 증가하여 500 µg을 첨가하였을 때 90%의 높은 활성을 나타내었다. 또한 pH 1.2에서 가장 높은 아질산염 소거활성을 나타내어, pH가 높아짐에 따라 아질산염 소거 활성이 점차 감소하는 것으로 나타났다. Seo 등(24)은 4종류 프로폴리스 에탄올 추출물의 아질산염 소거 활성을 분석한 결과 42.93~83.24%로 나타났으며, 특히 순천과 산청 시료에서 높은 소거 활성을 나타내었고, 이것은 quercetin을 비롯한 7종의 flavonoid에 기인한 것으로 보고하였다.

항균활성

프로폴리스를 각종 용매로 추출한 후 항균활성을 측정한 결과는 Table 1과 같다. 프로폴리스 용매별 추출물 중 50% 에탄올 추출물에서 높은 활성을 나타내었으며, 특히 *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* 및 *Vibro parahaemolyticus*에서 높은 활성을 나타내었다. 그 외 70% 에탄올 추출물, 물 추출물 및 95% 에탄올 추출물에서 높은 항균활성을 나타내지 않았다. 이는 전보(25)에 발표한 프로폴리스의 총 플라보노이드와 폴리페놀함량을 측정한 결과 50% 에탄올 추출물에서 가장 높은 함량을 나타내었는데, 이와 같은 성분에 의한 것으로 생각된다. 또한 Lee 등(26)은 영월산과 예천산 프로폴리스 용매 분획물의 항균활성을 조사한 결과 예천산 프로폴리스에서 높은 항균활성을 나타내었으며, 특히 에탄올과 부탄올 분획물이 강한 항균활성을 나타내었다고 보고하였다. 그리고 Obregon과 Rojas(27)는 쿠바산 프로폴리스를 이용하여 항균활성을 측정한 결과 용매에 대한 친지시간, 온

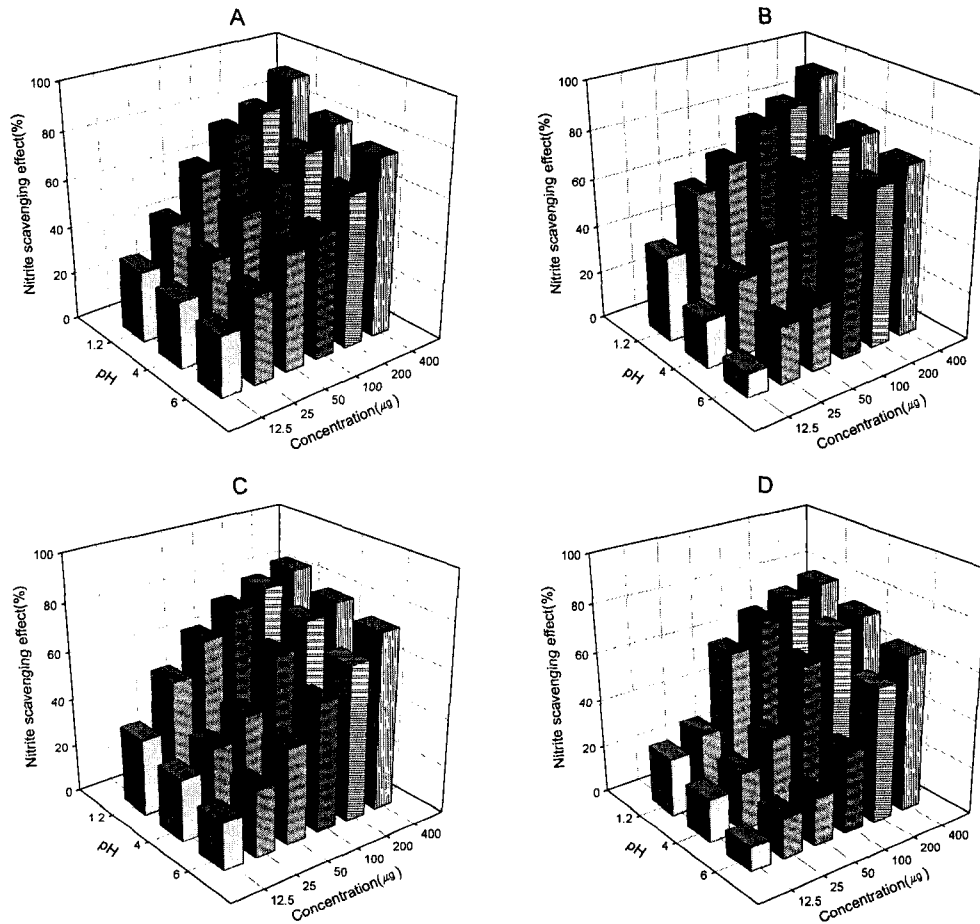


Fig. 6. Nitrite-scavenging effects of various solvent extracts from propolis. A: Water ext., B: 50% EtOH ext., C: 70% EtOH ext., D: 95% EtOH ext.

Table 1. Antimicrobial activities of various solvent extracts from propolis

Strain ²⁾	Clear zone on plate (mm) ¹⁾ (5.0 mg/paper disk)			
	Water ext.	50% EtOH ext.	70% EtOH ext.	95% EtOH ext.
Gram positive bacteria				
<i>Bacillus subtilis</i>	17	17	15	15
<i>Bacillus cereus</i>	16	17	14	14
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	15	14	11
<i>Streptococcus faecalis</i>	12	13	12	- ³⁾
<i>Streptococcus mutans</i>	11	12	12	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	14	15	14	9
Gram negative bacteria				
<i>Escherichia coli</i>	12	12	12	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11	12	11	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	11	12	12	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	16	16	13	9

¹⁾Diameter.

²⁾Strains were incubated on each medium at 37°C for 24 hr.

³⁾Not detected.

도, 농도 및 교반형태에 따라 그 활성이 다르게 나타났다고 보고하였다.

따라서 국내산 프로폴리스 추출물을 이용하여 천연 항균 소재 및 항균포장재료로 활용하기 위한 보다 더 구체적인 연구가 필요하다고 생각된다.

폐암 세포주에 대한 *in vitro* 세포독성

프로폴리스의 용매별 추출물을 이용하여 폐암세포주에 대한 세포독성을 측정한 결과는 Fig. 7과 같다. 프로폴리스의 각종 추출물을 이용하여 1, 10 및 100 µg/mL 농도로 각각 첨가한 후 A549(폐암)에 대한 *in vitro*에서의 세포독성을

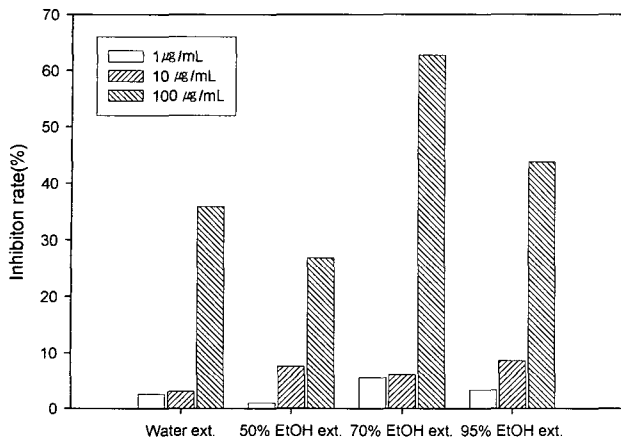


Fig. 7. Cytotoxicities of propolis extracts against human cancer cell (A549) lines *in vitro*.

조사한 결과 70% 에탄올 추출물 100 µg/mL를 첨가하였을 때 62.63%의 가장 강한 세포독성을 나타내었으며, 다음으로 95% 에탄올 추출물로서 43.75%, 물추출물 35.86%, 50% 에탄올 추출물 26.76% 순으로 나타났다. Lee 등(28)은 프로폴리스가 암세포의 증식 및 조직학적 관찰을 한 결과 HT-29 및 Hep G2 암세포의 증식을 효과적으로 억제 및 사멸시키는 현상을 나타내었으며, 세포의 모양도 변형, 위축 및 크기 분포가 현저히 감소되는 경향을 나타내었다고 보고하였는데 이와 같이 프로폴리스가 암세포의 증식을 억제하는 것은 프로폴리스 추출물내에 함유되어 있는 플라보노이드계 화합물과 폴리페놀 화합물에 기인한 것으로 보고하여 본 실험의 결과와 매우 유사한 경향을 나타내었다.

요 약

DPPH radical 소거 활성은 추출물의 농도가 증가함에 따라 높게 나타났으며, 추출용매별 radical 소거활성은 거의 유사한 경향으로 나타났다. 프로폴리스 추출물의 첨가농도가 증가함에 따라 환원력이 증가하는 경향을 나타내었으며, 특히 50% 에탄올 추출물이 가장 강한 환원력을 나타내었다. 유지에 프로폴리스 추출물을 첨가하여 과산화물, TBA 및 산가를 측정 한 결과 95% 에탄올 추출물이 가장 높은 산패 억제능을 나타내었다. 프로폴리스 추출물의 농도가 증가함에 따라 아질산염 소거 활성이 증가하였으며, 물추출물 500 µg을 첨가하였을 때 90%의 가장 높은 활성을 나타내었다. 프로폴리스의 각종 추출물을 이용하여 항균활성을 측정 한 결과 50%에탄올 추출물에서 가장 높은 활성을 나타내었으며, 특히 *Bacillus subtilis*균과 *Bacillus cereus*균과 같은 그람 양성균에서 높은 활성을 나타내었다. 프로폴리스의 각종 추출물을 이용하여 1, 10 및 100 µg/mL 농도로 각각 첨가한 후 A549(폐암세포)에 대한 *in vitro*에서의 세포독성을 조사한 결과 70% 에탄올 추출물 100 µg/mL를 첨가하였을 때 62.63%의 가장 강한 세포독성을 나타내었으며, 95% 에탄올

추출물, 물추출물 및 50% 에탄올 추출물 순으로 나타났다.

문 헌

1. MediHerb Newsletter. 1988. Propolis: A natural antibiotic. MediHerb Pty Ltd., Dec.
2. Marcucci MC. 1995. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 26: 83-99.
3. Bonvehi JS, Coll FV, Jorda RE. 1994. The composition, active components bacteriostatic activity of propolis in dietetics. *J Am Oil Chem Soc* 71: 529-532.
4. Greenaway W, May J, Scaysbrook T, Whatley FR. 1991. Identification by gas chromatography-mass spectroscopy of 150 compounds in propolis. *Zeitschrift fuer Naturforschung Teil C46*: 111-121.
5. Rice-Evans CA, Packer L. 1998. *Flavonoids in health and disease*. Marcel Dekker, New York.
6. Burdoc GA. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol* 36: 347-363.
7. Basnet P, Matsuno T, Neidlein R. 1997. Potent free radical scavenging activity of propolis isolated from Brazilian propolis. *Zeitschrift fuer Naturforschung Teil C52*: 828-833.
8. Nieva Moreno MI, Isla MI, Cudmani NG, Vattuone MA, Sampietro AR. 1999. Screening of antibacterial activity of Amalcha del Valle (Tucumán, Argentina) propolis. *J Ethnopharmacol* 68: 97-102.
9. Hausen BM, Evers P, Stüwe HT, König WA, Wollenweber E. 1992. Propolis allergy (IV). Studies with further sensitizers from propolis and constituents common to propolis, poplar buds and balsam of Peru. *Contact Dermatitis* 26: 34-44.
10. Miyataka H, Nishiki M, Matsumoto H, Fujimoto T, Matsuka M, Satoh T. 1997. Evaluation of propolis I. Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. *Biol Pharm Bull* 20: 496-501.
11. Lim DK, Choi U, Shin DH, Jeong YS. 1994. Antioxidative effect of propolis extract on palm oil and lard. *Korean J Food Sci Technol* 26: 622-626.
12. Han SK, Park HK. 1995. A study on the preservation of meat products by natural propolis: Effect of EEP on protein change of meat products. *Korean J Anim Sci* 37: 551-557.
13. Han SK, Park HK. 1996. Effect of ethanol extracted propolis on fat oxidation of meat products. *Korean J Anim Sci* 38: 94-100.
14. Kim CT, Lee SJ, Hwang JK, Kim CJ, Ahn BH. 1997. Effects of propolis addition on the shelf-life and staling of white bread. *Korean J Food Sci Technol* 29: 982-986.
15. Yang SY, Lee NH, Hong SP, Bang HA. 1999. Effects of propolis treatment on the quality of dried squid. *Korean J Food Sci Technol* 31: 356-360.
16. Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 25: 1199-1200.
17. Yen GC, Chen HY. 1985. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J Agric Food Chem* 43: 27-32.
18. Jeong CH, Shim KH. 2002. Nitrite-scavenging and antioxidant activities of wood vinegar. *Korean J Food Preservation* 9: 351-355.
19. Gray J, Dugan Jr LR. 1975. Inhibition of N-nitrosamine formation in model food system. *J Food Sci* 40: 981-985.
20. Farag RS, Daw ZY, Hewedii FM, El-Baroty GSA. 1989. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *J Food Prot* 52: 665-670.
21. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J,

- Vistica D, Warren JT, Bokesh H, Kenney S, Boyd MR. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82: 1107-1112.
22. Bankota AH, Tezuka Y, Adnyana IK, Midorikawa K, Matsushige K, Message D, Huertas AAG, Kadota S. 2000. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *J of Ethnopharmacol* 72: 239-246.
23. Kim H J, Hwangbo S, Lee SW. 2002. Studies on the antioxidant effect of Korean propolis. *Korean J Food Sci Ani Resour* 22: 77-80.
24. Seo KI, Oh IS, Oh DH, Choi SH, Shon MY, Moon JS. 2000. Quality characteristic and functional properties of ethanol extract of propolis. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 969-972.
25. Jeong CH, Bae YI, Lee HJ, Shim KH. 2003. Chemical components of propolis and its ethanolic extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 501-505.
26. Lee SW, Hwanbo S, Kim HJ. 2002. Antimicrobial activities of Korean propolis. *Korean J Food Sci Ani Resour* 22: 66-71.
27. Obregon FAM, Rojas HN. 1990. Antimicrobial action of alcoholic extracts of propolis. *Revista Cubana de Farmacia* 24: 34-44.
28. Lee HS, Lee JY, Kim DC, In MJ, Hwang WI. 2000. The inhibitory effect of propolis on in vitro proliferation of human cancer cell lines. *Korean J Nutr* 33: 80-85.

(2004년 10월 18일 접수; 2004년 12월 27일 채택)