

프로폴리스의 단백질합성저해활성 및 항진균활성

고아라¹ · 최갑성² · 최상기^{1*}

¹순천대학교 생물학과, ²순천대학교 식품공학과

Translation Inhibition Activity and Antifungal Activity of Korean Propolis. Goh, Ah-Ra¹, Kap Seong Choi², and Sang Ki Choi^{1*}. ¹Department of Biological Sciences at Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea, ²Department of Food Science and Technology at Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea – It has been known that propolis possesses anti-infective, anti-inflammatory, and anti-oxidative properties. Although antifungal activity of Propolis has already been demonstrated, very few studies has been conducted for action mechanism and its spectrum on fungi. We found that ethanol extract of propolis (EEP) inhibited *in vitro* translation. Since we also observed the growth inhibition of pathogenic fungi and anti-oxidative properties preliminarily, we try to see where those properties come from. Therefore we extracted the EEP further with chloroform, ethyl acetate and butanol. When their fractions were examined for the growth inhibition of *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida glabrata*, *Candida lusitanae*, *Cryptococcus neoformans*, chloroform fraction exhibited the highest anti-fungal as well as anti-oxidative properties. Similarly the chloroform fraction showed highest translation-inhibiting activities among the various Propolis fractions. These data indicate that those properties might come from similar compounds.

Key words: Propolis, antifungal, antioxidative, translation

서 론

Propolis는 일반적으로 45~55%의 수지와 방향족 화합물, 25~35%의 밀납 과 지방산 10%의 정유, 5%의 화분 및 5%의 각종유기물과 광물질 등으로 구성 되어있다. 약 150여종 이상의 화합물이 알려져 있다[12]. 그리고 Propolis의 구성 성분과 함량은 수집원이 되는 식물의 종류와 계절에 따라 다르기 때문에 채집지역에 따라 많은 차이가 있고 효능에도 다소 차이가 있다. 벌이 나무의 성장점과 수지 등을 이용하여 만드는 물질로 벌들은 Propolis를 이용하여 벌통의 틈새를 메워줌으로서 빗물이 스며드는 것을 방지하고, 외부로부터 벌통을 안전하게 차단시키기 위해 사용한다. 뿐만 아니라 벌집의 수리, 보수, 입구의 바람막이, 벌통에 침입한 침략자들 잔해의 부패 방지를 위해 밀봉하는 데에도 사용되어지며, 항균작용이 있어 벌통 내에서 질병이나 각종 미생물들의 성장도 억제시킨다[7].

주요 활성 성분은 식물색소인 flavonoids이며, 그 외에 유기산류, 페놀산류, 방향족 알콜 · 알데히드류, 쿠마린류, 비타민류, 미네랄류 등 다양한 성분들로 구성되어 있는데[6], 지금까지 알려진 Propolis의 주요 생물활성작용으로는 항균 작용, 항바이러스 작용, 혈관계 조절 작용, 항염증 및 항알

러지 작용, 항암작용, 항산화작용등이 밝혀졌으며, 그 작용 이전에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다[5].

Propolis는 세균감염치료제로서 기원전 300년 전에 이미 민간치료제로 이용되어 왔다[10]. Propolis의 항균활성은 수많은 연구에 의해서 검증되었고, 대부분의 연구는 *in vitro*로 이루어져 세균, 효모, 곰팡이 등 광범위한 미생물에 대해 효과적임이 알려져 있고 관련된 연구결과도 매우 많다[1].

이외에도 Propolis의 항균작용에 대한 보고는 많으나, Propolis의 산지, 추출방법에 따라 그 항균작용이 다르게 나타나고 있다. 수집한 Propolis를 이용하기 위해서는 원피 상태에서 유효성분을 추출하는 것이 필요하며, 주로 알코올을 사용하여 추출(Ethanol Extraction Propolis)하고 있다. 순수 알코올보다 80% 전후의 알코올 농도로 추출하는 것이 Propolis의 추출 수율이나 유효성분을 위하여 더 좋다고 알려져 있다[2].

현재 Propolis는 기능이 우수한 천연 항생제로 알려져 있어 세계적으로 많은 연구들이 진행되고 있으며, 인위적으로 만든 합성 물질과는 달리 Propolis는 자연친화적이며, 다른 음식과의 배합으로 인해 달라지는 기능을 가진 김치와 된장과 같은 발효식품과 달리 단독으로 활성을 보이며, 섭취하는데 제약이 따르지 않아 현재 Propolis에 대한 관심은 커지고 있다.

Propolis를 이용하여 병원성 곰팡이에 대한 항진균제를 개발하기 위한 방안을 모색하고자 Propolis 및 다양한 유기성 용매로 추출물질에 의한 다양한 병원성 곰팡이의 저해정도를 측정하였다. 또한 항산화 활성 및 *in vitro* 단백질 합성의

*Corresponding author

Tel: 82-61-750-3619, Fax: 82-61-750-3608

E-mail: sangkic@suncheon.ac.kr

저해정도를 측정하여 특성과 항진균 활성과의 연계관계를 검토하였다.

재료 및 방법

Propolis 분획

본 실험에서 사용된 Propolis 시료는 순천 서면에서 채집하였으며 10 g Propolis를 100 mL의 70% ethanol로 추출하였다. 이렇게 얻은 Propolis ethanol 추출물 10 mL를 chloroform, ethyl acetate, butanol 등의 용매로 추출하여 분획을 얻었다. Fig. 1과 같이 분획깔때기를 이용하여 각 단계마다 얻어진 용매추출물을, rotary vacuum evaporator를 이용하여 완전히 농축하였으며 다시 10 mL 에탄올에 녹였다 (Fig. 1). 동일한 양의 각각의 분획물에 대하여 항진균 활성 및 항산화 활성을 측정하였다.

Disc Diffusion Method

Propolis의 항진균활성을 검사하기 위해서 *Saccharomyces cerevisiae*를 YpD broth에 접종하여 30°C 항온기에서 overnight 배양하여 접종균주로 사용하였다.

Petri dish에 YpD 한천배지를 plate 높이의 2/3 정도 부어

서 굳힌 후, 여기에 시험용 균주를 100 µL 도말한다. Propolis ethanol 추출물을 paper disc에 흡수 시킨 다음 배지위에 올린 뒤 시료를 흡수시키고 배양기에서 배양하여 paper disc 주위의 clear zone의 크기로 항진균활성을 관찰하였다(Fig. 2).

항진균 활성 실험

RPMI 1640(Sigma, USA) 배지를 test tube에 5 mL 넣고 해당 효모균주를 접종 하고 30°C에서 overnight 배양하였

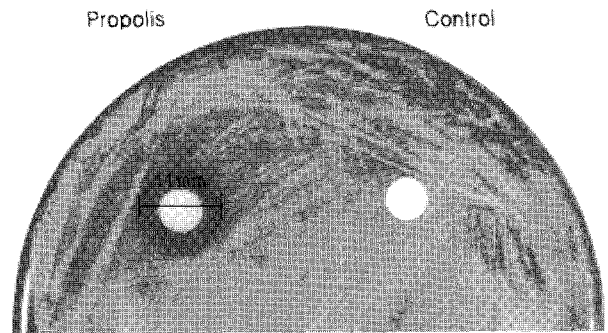


Fig. 2. Growth inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* by Propolis ethanol extract.

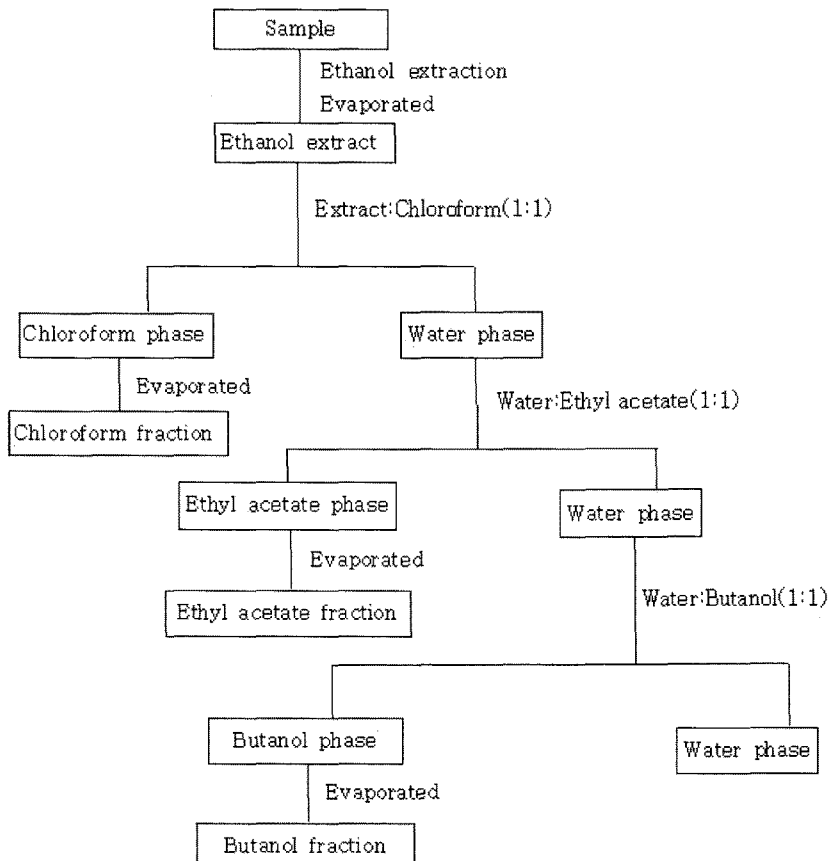


Fig. 1. Schematic diagram of solvent extraction of Propolis.

다. 배양액은 RPMI 배지로 희석하여 최종 O.D가 0.1이 되도록 한 후 96 well plate에 균을 10 µL씩 분주하였다. 그리고 RPMI 배지를 각각 100 µL씩 분주하고 여기에 추출물을 농도별로 10 µL씩 첨가하였다. 30°C incubator에 넣은 후 2 시간 단위로 ELISA reader(Dynex, Austria)로 600 nm에서 성장정도를 측정하였다. Propolis 분획에 의한 진균성장 저해실험은 3번 실험한 결과를 토대로 평균표준편차를 정하였다. 진균성장저해율(%)은 시료가 첨가되거나 첨가되지 않은 배지에서 일정시간 성장한 배양액의 흡광도를 측정한 후 다음과 같은 식에 따라 계산하여 얻었다.

$$\frac{[(\Delta\text{시료의 흡광도} - \Delta\text{대조군의 흡광도})/\Delta\text{대조군의 흡광도}] \times 100$$

DPPH radical 소거능

시료에 대한 DPPH radical 소거능은 2,2-diphenyl-β-picrylhydrazyl(DPPH)의 항산화능을 이용하여 ELISA reader로 540 nm에서 측정하였다. 즉, 각 추출물은 625배 희석한

Table 1. Growth inhibition of yeasts by various Propolis extraction fractions. (%)

| Strains | Fractions | Ethanol | Chloroform | Butanol | Ethyl acetate |
|--------------------------------|-----------|-----------|------------|----------|---------------|
| <i>Candida albicans</i> | | 70.3±3.5* | 16.0±5.1 | 14.5±3.1 | 7.7±1.2 |
| <i>Saccharomyce cerevisiae</i> | | 53.8±1.2 | 40.7±3.2 | 33.2±2.2 | 17.3±0.7 |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | | 42.3±0.4 | 41.4±1.0 | 26.1±2.1 | 13.6±2.0 |
| <i>Candida glabrata</i> | | 58.6±2.1 | 39.2±0.9 | 26.3±2.9 | 25.5±1.3 |
| <i>Candida lusitaniae</i> | | 62.4±2.5 | 48.7±1.8 | 35.1±6.2 | 24.1±1.1 |

*The values are mean ± S.D.

후 DPPH 용액을 첨가하였다. 추출액을 첨가하는 단계에서 대조군으로 0.1% butylated hydroxyl toluene(BHT) 용액을 사용하였고, blank로 50% 에탄올을 사용하였다.

시료를 첨가하고 난 후 빛이 차단된 어두운 곳에서 30분간 상온에서 반응시킨 다음 540 nm에서 흡광도를 ELISA reader로 측정하여 항산화능을 측정하였다.

Luciferase mRNA를 이용한 in vitro translation

Luciferase를 함유한 plasmid를 분리하여 *Bam*HI으로 처리하여 30°C에서 한시간 처리하여 전기영동한다[13]. 4 kb 크기의 luciferase DNA를 분리하였다. 분리한 DNA를 *in vitro* transcription 하여 mRNA를 얻었으며 이를 *in vitro* translation assay에 사용하였다. 효모를 배양한 다음 균을 회수하여 Song 등(2006)의 방법으로 분획들을 모아서 실험에 사용하였으며 이를 단백질 합성 추출액이라 한다[13]. 단백질 합성 cocktail은 단백질합성 반응액에 다음과 같은 최종 농도가 되도록 만들어 준비하였다: 22 mM HEPES buffer, pH 7.4, 120 mM KOAc, 2 mM MgOAc, 0.75 mM ATP, 25 mM creatine phosphate. 0.04 mM 20종류의 전체 아미노산, 1.7 mM dithiothreitol, 0.1 mM GTP, 0.1 unit creatine phosphokinase, 0.1 unit ribonuclease inhibitor(Promega, USA). 단백질 합성은 25°C에서 단백질합성추출물, cocktail 그리고 luciferase mRNA 존재하에 행하였으며, 특정시료(Propolis 분획물)가 단백질합성 저해능력이 있는지를 측정하기위해 단백질합성 반응액 10 µL에 인광반응기질 100 µL를 넣어 합성된 luciferase의 활성을 인광측정기(Molecular Devices, U.S.A.)로 측정하였다.

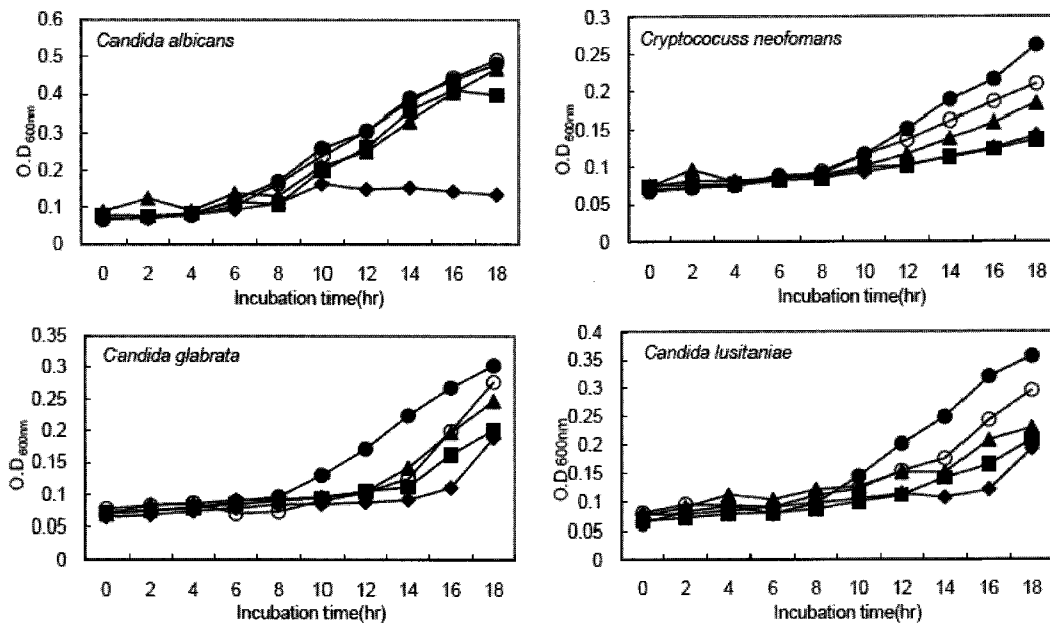


Fig. 3. Growth inhibition of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida glabrata* and *Candida lusitaniae* by various extraction fractions. Symbols: ●, control; ◆, ethanol; ■, chloroform; ▲, butanol; ○, ethyl acetate.

결과 및 고찰

Disc Diffusion Method

Propolis의 효과를 *in vivo*상에서 알아보기 위해 disc assay 방법을 사용하였다. Whatman filter paper에 10 µL를 분주하여 농축시킨 후, Fig. 2와 같이 paper disc를 YpD 고체배지에 놓고 위에 전날 배양시킨 효모 균주를 overlay시켜 물기를 다 말린 다음, 30°C에서 2~3일 배양 후, 투명 환의 생성여부로 알아보았다. 실험 결과 물에 적신 대조군에서는 뚜렷한 변화를 관찰하지 못한 반면에 Propolis ethanol 추출물이 첨가된 paper disc 주변에 11 mm의 투명환이 관찰되어 Propolis가 효모균주의 성장을 저해하였음을 확인할 수 있었다.

Propolis 분획 및 용매 분획물에 따른 액체배지에서의 항진균 활성 측정

Ethanol extract 10 mL를 chloroform, ethyl acetate, butanol을 용매 순으로 추출하였으며 각각을 evaporation 시킨 후에 chloroform 분획, ethyl acetate 분획, butanol 분획으로 농축시켰다. 각각의 추출물 존재 하에 곰팡이의 성장 저해율을 조사하였다. 추출물을 약 100배 희석하여 배양액에 최종 약 8%가 되도록 첨가한 후 24시간 배양하였다. Propolis ethanol 추출물에 가장 크게 민감성을 보이는 균주는 *Candida albicans*였다(Table 1). *Candida albicans*의 저해율은 ethanol 분획에서 70.32%로 저해율이 가장 높고 나머지 chloroform 분획, butanol 분획의 저해율이 15.98%, 14.48%를 각각 나타냈으며 ethyl acetate 분획은 가장 적은 7.72%의 저해율을 나타냈다. *Candida lusitanae*의 경우에는 chloroform 분획의 저해율이 48.67%로 다른 균주들에 비해서 민감도가 가장 높았으며 butanol 분획에서의 민감도도 35.12%로 다른 균주들에 비해 높았다. Ethyl acetate 분획은 다른 분획들에 비해서 균주성장 저해율이 비교적 낮은 편이었는데 *Candida glabrata*에 대해서는 25.46%의 저해율로 가장 높은 민감도를 보였다.

다른 균주들에서의 경우도 ethanol 추출물이 가장 큰 저해율을 나타냈고 ethyl acetate 분획에서 가장 적게 저해되었다. 분획들 중에서 chloroform 분획에 곰팡이성장 저해성분들이 많이 포함되어 있는 것으로 추정된다(Fig. 3, Table 1).

항산화 활성

일반적으로 항산화 물질은 radical scavenger, peroxide decomposer, singlet oxygen quencher, enzyme inhibitor 및 metal chelator 등의 기능적 특성을 지닌 것으로 알려져 있다. 항산화 물질들은 free radical을 제거하므로 free radical에 의한 지질, 단백질, 세포막 및 DNA의 손상을 방지하여 발암성을 억제하고 노화를 지연시키는 것으로 추정되고 있다.

DPPH는 안정한 라디칼로 cysteine, glutathione 등과 같은

아미노산, ascorbic acid, tocopherol 등 다양한 항산화물질에 의하여 환원되어 짙은 자색이 탈색되므로 라디칼의 소거하는 특성을 이용한 수소공여능, 유리기 소거작용 등 항산화 효과를 측정하기 위하여 널리 사용되고 있다. 이와 같은 항산화성 특성을 보이는 Propolis에서 항산화성 물질이 어느 분획에 많이 존재하는지를 조사하였다.

항산화제는 free radical과 반응하므로 이와 같은 DPPH의 성질을 이용하여 625배 희석한 Propolis 분획물들과 합성 항산화제인 BHT의 수소공여능을 비교하였다(Fig. 4). Ethanol 분획물의 수소공여능은 Fig. 4에서 보는 바와 같이, 합성항산화제인 0.1% BHT의 수소공여능 83.36%보다 높았으며 분획들 중에서 chloroform 분획이 가장 수소공여능이 높았다.

분획물을 25배까지 희석했을 때 까지만 해도 거의 전체적으로 값의 차이가 많지 않고 수소공여능이 높았다. 125배로 희석하였을 때 chloroform, butanol, ethyl acetate 순서로 수소공여능의 값이 낮아졌다(data not shown).

Luciferase mRNA를 이용한 *in vitro* translation

Fig. 5에서 보는 바와 같이 항진균 활성을 보이는 방선균 배양액 G1, G18[13]에 비해 Propolis ethanol 추출물이 단백

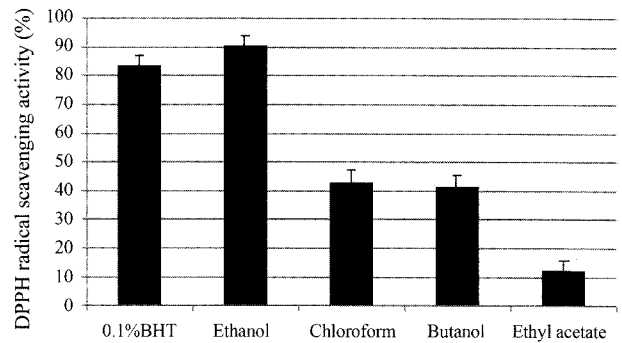


Fig. 4. Anti-oxidative activities of various Propolis extraction fractions. The results are given as mean±S.D. of three experiments. The error bars represent the standard error of the means.

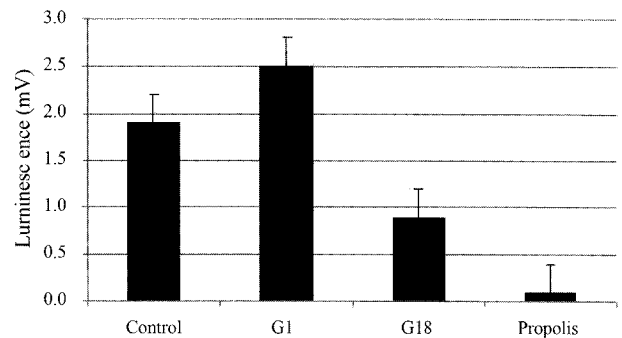


Fig. 5. Effect of Propolis ethanol extract and microbial culture filtrates on *in vitro* translation reaction. G1 and G18 are culture filtrates of *Streptomyces* spp. isolates [13]. The microbial culture filtrates and Propolis ethanol extract were diluted 1,000-fold with distilled water and added to *in vitro* translation assay reaction. Distilled water was used as a control.

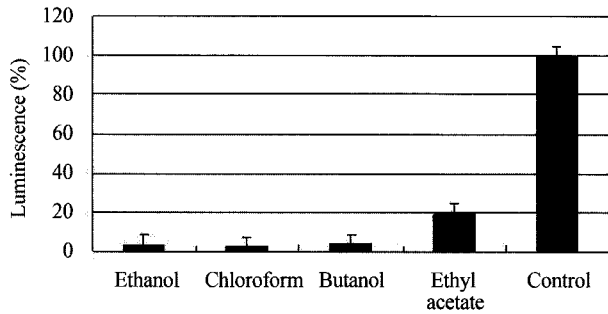


Fig. 6. Effect of various Propolis extraction fractions on the *in vitro* translation reaction. Propolis ethanol extract and various fractions were diluted 1,000-fold with distilled water and added to *in vitro* translation assay reaction.

질합성 저해활성이 관찰되었다. 따라서 이러한 활성이 항진균 및 항산화 활성과 어떤 연관 관계를 갖는지 알아보기 위해 각 추출물의 단백질 합성 저해정도를 측정하였다.

평균수를 넣은 대조군과 비교해 1,000배 희석한 Propolis 분획들의 단백질합성 저해활성이 전체적으로 현저히 낮은 것을 볼 수 있다(Fig. 6). Ethanol 추출물, chloroform과 butanol 분획이 *in vitro* 단백질합성의 활성을 크게 저해하였으며 그 중에서도 chloroform 분획에서 가장 크게 단백질합성을 저해하였다. 이는 진균성장 저해실험에서 관찰되었던 것처럼 chloroform 분획에서 단백질 합성반응을 저해하는 물질이 가장 많이 있는 것으로 추정할 수 있었다(Fig. 6).

Propolis에 존재하는 flavonoid가 항산화활성, 항균활성을 갖는 것으로 보고되었듯이[8] 이번 결과에서 얻어진 항진균 및 단백질합성 저해활성이 flavonoid 등 Propolis 내 어떤 물질에 기인하는 지는 앞으로 연구되어야 할 과제이다.

요 약

본 실험은 Propolis ethanol 추출물과, chloroform, ethyl acetate, butanol 등 4가지 용매로 더 추출한 분획들을 이용하여 DPPH radical 소거능 실험과 항진균활성을 알아보고, 고체배지 및 액체배지에서 항진균활성을 측정하였다. 또한 luciferase mRNA를 이용한 *in vitro* translation으로 이들 추출물에 의한 단백질합성의 영향을 검토하였다.

첫 번째로, 액체배지에서의 항진균 활성을 실험한 결과 *Candida glabrata*, *Candida lusitanae* 그리고 *Cryptococcus neoformans* 등의 성장저해율이 chloroform 분획 존재하에서 각각 39%, 41%, 48% 이었으며 ethyl acetate 분획 존재하에서 각각 25%, 24%, 13%로 측정되었다. 이 결과는 ethyl acetate 분획에 비해 chloroform 분획에 진균 성장 저해물질이 가장 많이 존재함을 나타낸다.

두 번째로, 동일한 비율로 희석한 프로폴리스 분획물들과 합성 항산화제인 BHT의 수소공여능을 비교하였을 때 Ethanol 추출물의 수소공여능은 합성항산화제인 0.1% BHT

의 수소공여능보다 높았으며, 분획들 중에서 chloroform 분획이 가장 수소공여능이 높았다.

세 번째로, luciferase mRNA를 이용한 *in vitro* translation 실험에서는 Propolis ethanol 추출물이 단백질합성을 저해하는 것으로 관찰되었다. Propolis 분획물들 중에서 chloroform 분획이 단백질 합성을 가장 많이 저해하였다.

이와 같은 결과는 chloroform 분획물이 다른 분획에 비해 수소공여능, 진균성장 저해율 및 단백질합성 저해활성이 가장 큰 것으로 보여지므로 이 분획물에 대한 생화학적인 연구가 요구된다.

감사의 글

이 논문은 2009년 한국연구재단의 일반연구지원사업의 지원을 받아 수행된 연구임(2009-0072519).

REFERENCES

- Braileau, C. L., A. P. Gheorghiu, and G. H. Velescu. 1969. Pharmaceutical drugs containing propolis. *Apicultura*. **21**: 20-25
- Chernyak, N. F. 1973. On synergistic effect of propolis and some anti-bacterial drugs. *Anti-biotila*. **18**: 259-261
- Cho, J. S., Y. H. Kim, and M. S. Kwon. 2005. Antibacterial effects of Propolis extract on pathogenic bacteria. *J. East Asian Soc. Dietary Life*. **15**: 457-464
- Ghisalberti, E. L. 1979. Propolis: A review. *Bee World*. **60**: 59-84
- Grange J. M. 1990. Antibacterial properties of propolis(bee glue). *J. Royal Soc. Med*. **83**: 159-160
- Greenaway, W., J. May, T. Scaysbrook, and F. R. Whatley. 1990. Identification by gas chromatography mass spectrometry of 150 compounds in propolis. *Z. Naturforsch.* **46**: 111-121.
- Hur, Y. K., N. R. Kim, W. K. Yoon, S. K. Jo, U. H. Jung, and H. R. Park. 2007. Properties of korean propolis on the antibacterial activity and inhibition of antibiotic-resistant bacteria. *Korean J. Apiculture*. **22**: 71-78
- Koo, H., P. L. Rosalen, J. A. Cury, G. M. Ambrosano, R. M. Murata, R. Yatsuda, M. Ikegaki, S. M. Alencar, and Y. K. Park. 2000. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutans Streptococci. *Curr Microbiol*. **41**: 192-196.
- Lee, S. W., S. Hwangbo, and H. J. Kim. 2002. Antimicrobial Activities of Korean Propolis. *J. Food Sci. ANI Resour*. **22**: 66-71
- Miyataka, H., M. Nishiki, H. Matsumoto, T. Fujimoto, M. Matsuka, and T. Satoh. 1997. Evaluation of propolis. I. Evolution of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. *Biol. Pharm. Bull.* **20**: 496-501
- Seo, K. I., I. S. Oh, M. Y. Shon, and S. H. Choi. 2000.

- Quality characteristics and functional properties of ethanol extract of propolis. *J. Food Sci. Nutr.* **29**: 969-972
12. Son, Y. R. 2003. Studies on the antimicrobial effect of extracts of propolis. *J. Fd Hyg. Safety.* **18**: 189-194
 13. Song, C. H., H. R. Paik, C. N. Seong, and S. K. Choi. 2006.

An *in vitro* assay to screen for translation inhibitors. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 1646-1649

(Received Oct. 18, 2009/Accepted Feb. 25, 2010)