

산도에 따른 봉독의 성분 및 생리활성에 대한 안정성

조미란 · 한상미* · 김정민 · 여주홍 · 홍인표 · 우순옥 · 이광길
농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부

Stability of main components and physiological activities of bee venom treated with pH

Miran Cho, Sangmi Han*, Jungmin Kim, Joohong Yeo, InPhyo Hong, Soonok Woo and Kwanggill Lee
Department of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-853, Korea

(Received March 19, 2014, Accepted May 02, 2014)

ABSTRACT

This study was for the investigation of the stability of purified bee venom (PBV) during the treatment in the pH range from pH2 to pH9 for 24 hours, respectively. Changes of components and physiological functionalities in PBV were by evaluated silver staining, and melittin contents were measured by liquid chromatography. The antimicrobial activity against bacteria by minimum inhibitory concentration (MIC) and effect of the cell regeneration were measured by 3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay using human dermal fibroblast (HDF) cell. The main proteins such as melittin and phospholipase A₂ showed no characteristic changes. The antimicrobial activity and effect of cell regeneration showed no difference from pH2 to pH9. From this study, we suggest that components and physiological functionalities of PBV against treated pH were kept stability at from pH2 to pH9.

Key words : *Apis mellifera*, Bee venom, Component, pH

서 론

봉독은 꿀벌(*Apis mellifera* L.)의 독낭에 들어있는 자기 방어 물질로 봉침은 수천년 전부터 관절염, 통풍 등(Kim et al. 2002, Kim et al. 2003) 치료에 한방과 민간요법으로 이용되어 왔다(Kim 1992). 봉독은 40여 가지의 성분으로 이루어져 있으며, peptide 성분으로는 melittin, apamin, mast cell degranulating(MCD) peptide 등이 있으며, 효소 성분으로는 phospholipase A₂, hyauronidase, acid phosphomonoesteras, 유기성분으로는 histamin, dopamin, noradrenaline 등의 물질로 구성되어 있다(Habermann and Reiz 1965, Kim 1992). 그 중 멜리틴(melittin)은 건조 봉독의 50% 이상을 차지하는 주요성분으로 항염증(Piek 1986, Habermann and Reiz 1965)과 항균작용(Fennell et al. 1968), 강력한 진통작용(Curcio-Vonlanthen et al. 1997), 면역증강(Rudenko and Nipot 1996) 등의 역할을 한다. 특히, 봉독은 여드름 유발균인 *Propionibacterium acnes*와 피부에 염증을 유발하는

피부 상재균주인 *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus pyogens* 및 *Staphylococcus aureus*에 강한 항균력을 갖고 있는 것으로 확인되었다(Han et al. 2010). 최근 자외선에 의해 손상된 피부의 재생을 촉진한다는 연구결과가 발표됨에 따라 화장품의 원료로 각광 받고 있다(Han et al. 2011). 뿐만 아니라 강한 항균 및 항염증 효과에 따라 양식 어류의 사료, 소, 돼지 등의 가축적용 항생제로 사용되고 있다(Han et al. 2009).

그러나 봉독을 원료로 한 화장품, 사료 및 의약품 등 제품을 개발하는 과정에서 발생할 수 있는 다양한 산도 변화가 봉독의 성분과 약리효과에 대한 연구는 보고된 바가 없다. 어떠한 영향을 미치는지에 대한 연구가 필요하다. 따라서, 본 연구에서는 봉독이 각기 다른 pH에서 처리되었을 경우 어떠한 성분 및 생리활성 변화가 초래되는지를 확인하여 봉독을 이용한 소재 개발에 기초 자료로 제공하고자 한다.

*Corresponding author. E-mail: sangmih@korea.kr

재료 및 방법

1. 봉독 시료 및 pH 처리

국내에서 사육중인 서양종꿀벌로부터 봉독채집장치((주) 청진바이오텍, 한국)를 사용하여 채취된 봉독을 봉독의 간이정제방법(Han et al. 2007)을 사용하여 정제한 정제봉독을 사용하였다. pH buffer는 NaOH과 HCl을 사용하여 pH2부터 pH9까지 제조한 후 pH meter(Mettler toledo, Swiss)로 확인하여 사용하였다. 정제봉독은 각각 pH2에서부터 pH9까지 제조용액에 100 mg/ml의 비율로 24시간 반응시킨 후 동결건조를 통해서 건조 봉독을 회수하여 실험에 사용하였다.

2. 멜리틴 함량 분석

봉독의 주요성분 분석용으로 멜리틴(Sigma, USA)을 사용하였다. 분석용매로는 ammonium formate(Sigma, USA), acetonitrile(Sigma, USA), trifluoroacetic acid(Sigma, USA)와 물은 HPLC용 등급을 사용하였다. 정제 봉독은 액체크로마토그래피(AKTA explorer, Pharmacia, USA)를 사용하여 확인하였다. Sephadex TM75(Pharmacia, USA) 및 Source 15RPC ST(Pharmacia, USA) 컬럼을 사용하였으며, 봉독성분 중에 멜리틴 함량은 아래와 같은 식으로 구하였다.

$$\text{표준품 취한 양 (mg)} \times \frac{\text{표준품의 순도}}{100}$$

$$\frac{\text{봉독 중의 원하는 성분 피이크 면적}}{\text{표준품의 피이크 면적}} \times \frac{100}{\text{봉독 취한양 (100)}}$$

3. Silver staining

SDS-polyacrylamide gel은 Laemmli(1970)의 방법을 따라 15%의 separation gel과 5%의 staking gel을 준비하였다. Mini protein electrophoresis assay unit(Bio-Rad Laboratories, USA)를 이용하여 100 V 400 mA에서 1시간 30분 동안 분리시킨 후 silver staining plus kit(Bio-Rad Laboratories, USA)를 이용하여 염색하였다.

4. 최소성장억제농도 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) 측정

pH별로 처리된 봉독의 생리활성 변화를 알아보기 위하여 항균력을 측정하였다. 본 연구에서 사용한 균주는 피부 상재균인 *Staphylococcus aureus*(ATCC 6538), 여드름 원인균인 *Propionibacterium acnes*(ATCC 6919), 충치의 원인균인 *Streptococcus mutans*(ATCC 25175), 대장균

Escherichia coli(ATCC 11105)로 한국미생물균주은행(서울, 한국)으로부터 분양받아 사용하였다.

*S. aureus*는 trypticase soy(TS) broth(Difco Laboratories, USA)를 사용하여 37°C에서 18시간 동안 호기조건으로 배양하여 시험에 사용하였고, *E. coli*의 경우 nutrient broth(Difco Laboratories, USA)를 사용하여 배양하였다. 여드름 원인균인 *P. acnes*를 reinforced clostridial medium를 사용하여 37°C에서 18시간 혐기조건으로 배양한 후 시험에 사용하였고, *S. mutans*의 경우 brain heart infusion(Difco Laboratories, USA)를 사용하여 배양하였다. 액체배지 희석법에 의한 여드름 원인균인 *P. acnes*, 피부상재균인 *S. aureus*, 충치균인 *S. mutans* 그리고 대장균인 *E. coli*에 대한 최저 성장억제농도를 구하였다. 정제봉독은 멸균 증류수로 희석한 후 무균 여과하여 액체배지희석법에 준하여 단계적으로 희석하였다(Wu and Hancock 1999). 각각의 접종 균은 봉독 시료와 함께 18시간 동안 배양한 후 흡수과장 405 nm에서 흡광도를 측정하여 순수배양액의 흡광도 값과 같은 결과를 얻은 것을 최소억제농도로 결정하였다.

5. 세포 증식률 측정

pH에 따른 봉독의 피부세포에 대한 증식효과를 알아보기 위하여 human dermal fibroblast(HDF) 세포를 이용하여 확인하였다. HDF 세포는 MCTT사(MCTT, 한국)로부터 구입하여 FGM-2 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 계대 배양하여 실험에 사용하였다. 배양세포가 바닥 면적의 90% 가량 차도록 자라게 하면 계대배양을 하고 대수 성장기의 세포를 실험에 사용하였다. HDF 세포를 96-well plate에 1 × 10⁴ cell/ml로 하여 분주하여 하루 동안 배양하여 부착시키고 새로운 배지로 교환한 다음 다양한 농도의 봉독을 처리하였다. 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양한 후 세포 생존율을 3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) 시약으로 처리하여 4시간 동안 반응시킨 후 DMSO를 첨가하여 ELISA reader(BioTek instrument, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하여 봉독의 세포증식률을 측정하였다(Mosmann 1983).

6. 통계처리

실험의 분석결과는 평균 ± 표준오차(mean ± S.E.)로 표시하였고, 모든 자료는 SPSS 프로그램(Statistical Package for Social Science, version 18.0, SPSS Inc., USA)을 이용하여 처리하였다. 반복측정에 의한 one-way 분산분석(ANOVA)을 시행하여 F값을 구하고 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의성 차이를 검증하였다.

Table 1. Contents of melittin in purified bee venom (PBV) treated with pH2 to pH9 buffer, respectively, for 24 hours by liquid chromatography

Contents of melittin (%)	pH								
	Control	2	3	4	5	6	7	8	9
	57.2 ± 1.3	54.7 ± 2.1	55.6 ± 1.9	57.2 ± 0.6	56.3 ± 2.6	54.8 ± 5.4	52.8 ± 5.6	54.1 ± 2.3	53.7 ± 3.9

*Data represent mean ± S.E. of three independent experiments.

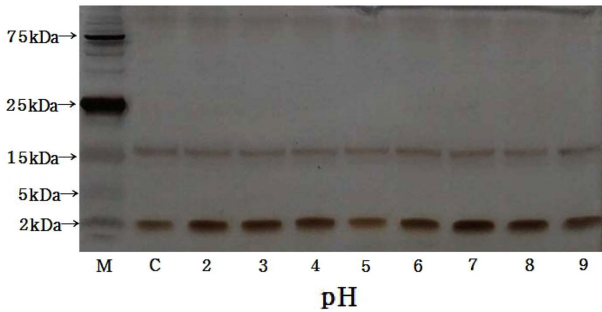


Fig. 1. Analysis of components in purified bee venom (PBV) treated with pH2 to pH9 buffer, respectively, for 24 hours by silver staining. (M; size marker, C; Control).

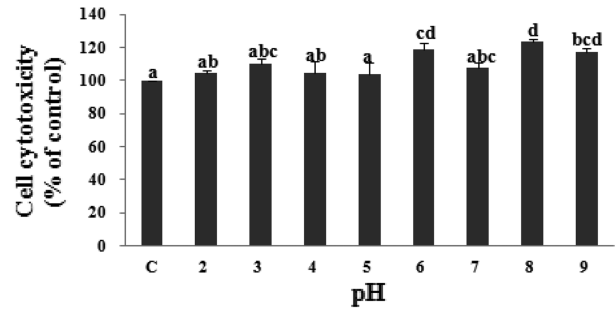


Fig. 2. Effect of cell regeneration in purified bee venom (PBV) treated with pH2 to pH9, respectively, for 24 hours on human dermal fibroblast. Different letters indicate a significant difference with $p < 0.05$.

결과 및 고찰

1. pH 처리에 따른 정제봉독의 멜리틴 함량

항균 및 항염증 등 다양한 약리효과를 갖는 봉독의 제품개발을 위하여 강산 또는 강염기 조건에 놓이게 되는 경우가 발생할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 봉독의 주요성분이며 생리활성물질인 멜리틴 성분이 산도에 따라 영향을 받는지를 확인하고자 하였다. pH2에서 pH9까지 각각의 pH 조건별로 정제봉독을 24시간 처리 한 후 멜리틴 함량을 액체크로마토그래피를 사용하여 측정하였다. 그 결과 표 1에서 보는 바와 같이, 처리 전 멜리틴 함량은 57.2 ± 1.3 이었으며, 강산인 pH2에 처리된 정제봉독은 54.7 ± 2.1 , 강염기인 pH9에서는 53.7 ± 3.9 로 대조구에 유의할 만한 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과로 미루어 봉독의 주요성분인 멜리틴은 산도에 영향을 받지 않는 것으로 사료된다.

2. pH 처리에 따른 정제봉독의 단백질 성분 변화 분석

pH별 처리에 따른 정제봉독의 단백질 성분 변화를 관찰하기 위해 전기영동을 실시하였다. 그 결과 그림 1에서 보는 바와 같이 멜리틴(2.84 kDa)은 pH2에서부터 pH9까지 다양한 산도에 처리했을 경우에도 성분의 변화가 확인되지 않았다. 또한 정제봉독의 주요 효소 성분인 포스포리파아제 A₂(phospholipase A₂, 17 kDa) 산도 변화에 따른 차이점은 전혀 관찰되지 않았다. 따라서 봉독의

Table 2. Minimum inhibitory concentration (MIC) of purified bee venom (PBV) against various bacteria treated with pH2 to pH9 buffer, respectively

pH	MIC (µg/ml)			
	<i>S. aureus</i>	<i>P. acnes</i>	<i>S. mutans</i>	<i>E. coli</i>
Control	11.424	22.314	68.096	22.314
2	11.424	17.851	68.096	22.314
3	9.140	17.851	68.096	17.851
4	9.140	22.314	68.096	17.851
5	9.140	17.851	68.096	22.314
6	11.424	22.314	68.096	22.314
7	9.140	14.281	68.096	17.851
8	9.140	17.851	68.096	22.314
9	9.140	17.851	68.096	22.314

주요 단백질 성분은 산도에 영향을 받지 않는 것으로 확인되었다.

3. 최소성장억제농도 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC)

pH별로 처리한 정제봉독의 항균력을 측정한 결과는 표 2와 같았다. *S. aureus*, *E. coli*와 *P. acnes*에 대한 항균력은 pH에 따라 다소 차이를 보였으나 유의할 만한 차이를 갖고 있지 않았다. 특히 *S. mutans*에서는 강산과 강염기

에 대해서도 항균력의 차이는 전혀 확인되지 않았다. 이러한 결과를 미루어 pH의 처리는 정제봉독의 항균력에 어떠한 영향도 미치지 않는 것으로 사료된다.

4. pH 처리에 따른 정제봉독의 피부세포 재생에 미치는 영향

pH에 따른 정제봉독의 세포 재생에 미치는 영향을 알아보기 위하여 피부세포인 HDF 세포주를 이용하였다. 피부세포 증식에 효과적인 농도로 알려진 100 ng/ml의 농도로 봉독을 처리한 결과 그림 2에서 보는 바와 같이 산도와 관계없이 세포증식에 효과적이었다. 따라서 다양한 산도로 봉독을 처리하더라도 피부세포 증식에는 영향을 주지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

적 요

서양종 꿀벌로부터 봉독채집장치를 이용하여 채집한 정제봉독의 pH 안정성에 대하여 평가하고자 멜리틴의 함량, 단백질의 변화, 항균력, 세포증식률을 측정하였다. 정제봉독을 pH2에서 pH9까지 24시간 동안 처리한 후 멜리틴 함량과 단백질의 변화, *S. aureus*, *P. acnes*, *S. mutans*와 *E. coli*에 대한 항균력, 피부세포인 HDF에 대한 세포증식률에 미치는 영향을 분석하였다. pH2에서부터 pH9까지 각각 처리한 정제봉독의 멜리틴 및 단백질 성분의 변화는 확인되지 않았다. 봉독의 주요 약리효과인 항균력에 있어서도 시험균주마다 다소 차이가 있었으나 *S. aureus*, *P. acnes*, *S. mutans*와 *E. coli* 모두 산도에 따른 유의할 만한 변화는 확인되지 않았다. 또한 피부세포 증식률에 있어서도 산도에 따른 변화는 확인되지 않았다. 이러한 결과로 미루어 봉독의 pH처리는 멜리틴 함량, 단백질의 변화, 항균력 및 세포증식률에 영향을 주지 않는 것으로 확인되어 봉독은 산도의 변화에 있어 안정성이 매우 높은 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 차세대 바이오그린21사업(과제번호: PJ00953403)의 지원에 의하여 수행되었습니다.

References

- Curcio-Vonlanthen V, Schneider CH, Frutig K, Blaser K, Kalbacher H (1997) Molecular parameters in melittin immunogenicity. *J Pept Sci* **3**(4), 267~276.
- Fennell JF, Shipman WH, Cole LJ (1968) Antibacterial action of melittin polypeptide from bee venom. *Proc Soc Exp Biol Med* **127**(3), 707~710.
- Habermann E, Reiz KG (1965) On the biochemistry of bee venom peptides, melittin and apamin. *Biochem Z* **343**(2), 192~203.
- Han SM, Lee KG, Yeo JH, Hwang SJ, Jang CH, Chenoweth PJ, Park SC (2009) Effects of bee venom treatment on growth performance of young pigs. *Am J Chin Med* **37**(2), 253~260.
- Han SM, Lee KG, Yeo JH, Kweon HY, Baek HJ, Park KK (2010) Antibacterial and anti-inflammatory effects of honeybee (*Apis mellifera*) venom against acce-inducing bacteria. *J Med Plat Res* **4**, 459~464.
- Han SM, Lee KG, Yeo JH, Kim WT, Park KK (2011) Biological effects of treatment of an animal skin wound with honeybee (*Apis mellifera* L.) venom. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* **64**(3), e67~72.
- Han SM, Lee KG, Yeo JH, Woo SO, Kweon HY (2007) Simplified purificating method of bee venom. Patent 10-0758814.
- Kim HW, Kwon YB, Ham TW, Roh DH, Yoon SY, Lee HJ, Han HJ, Yang IS, Beitz AJ, Lee JH (2003) Acupoint stimulation using bee venom attenuates formalin-induced pain behavior and spinal cord fos expression in rabbit. *J Vet Med Sci* **65**(3), 349~355.
- Kim MH (1992) Bee venom therapy. pp.112~124. Korea education. Seoul.
- Kim MJ, Park SD, Lee AR, Kim KH, Jang JH, Kim KS (2002) The effect of bee venom acupuncture on protease activity and free radical damage in synovial fluid from collagen - induced arthritis in rats. *Acupuncture* **19**, 161~175.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680~685.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **16**, 55~63.
- Piek T (1986) Venoms of the Hymenoptera. Academic press, London. United Kingdom.
- Rudenko SV, Nipot EE (1996) Modulation of melittin-induced hemolysis of erythrocytes. *Biokhimiia* **61**(12), 2116~2124.
- Wu M, Hancock RE (1999) Interaction of the cyclic antimicrobial cationic peptide bactenecin with the outer and cytoplasmic membrane. *J Biol Chem* **274**(1), 29~35.