



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

국내 제주도에서 수집된 Propolis의
특성 및 생리활성에 관한 연구



東亞大學校 大學院

食 品 科 學 科

崔 秀 眞

2011 學 年 度

국내 제주도에서 수집된 Propolis의 특성 및 생리활성에 관한 연구

指導教授 安 木 蓮

이 論文을 理學碩士學位
請求論文으로 提出함

2011年 12月

東亞大學校 大學院

食 品 科 學 科

崔 秀 眞

崔秀眞의 理學 碩士學位
請求 論文을 認准함

2011年 12月



委 員 長 田 美 羅 印

副委員長 朴 仁 植 印

委 員 安 木 蓮 印

국내 제주도에서 수집된 Propolis의 특성 및 생리활성에 관한 연구

Studies on Characteristics and Biological Activities
of Propolis Collected on Jeju Island, Korea

식품과학과 최 수 진
지도교수 안 목 련

본 연구는 국내 제주도에서 수집된 propolis의 수집된 지역별 특성과 항산화, 항균 및 항곰팡이 활성에 관하여 조사하였다.

제주도에서 수집된 propolis의 페놀성 화합물(polyphenol compounds)은 59.7~126.8 mg/g of EEP로 북제주 노형(J2)에서 수집된 propolis가 가장 높은 함량을 나타내었으며, 북제주 한림(J5)에서 수집된 propolis가 가장 낮은 함량을 나타내는 것으로 나타났다. 제주도에서 수집된 propolis의 총 flavonoid 함량은 42.1~108.8 mg/g of EEP로 남제주 표선(J4)에서 수집된 propolis가 가장 낮은 함량을 나타내었고, 북제주 애월(J1)에서 수집된 propolis가 가장 높은 총 flavonoid 함량을 나타내었다.

High performance thin-layer chromatography(HPTLC) gel 상에서 제주도산 propolis의 구성성분 pattern을 분석한 결과 남제주 표선(J4)에서 수집된 propolis를 제외한 다른 지역에서 수집된 propolis(J1~J3, J5, J6)는 비슷한 양상의 band pattern을 나타내었으며, 다소 미약한 band가 확인되었으나 구성성분의 차이는 확인되지 않았다. 남제주 표선(J4) 수집된 propolis는 다른 지역에서 수집된 propolis와 상이한 band pattern을 나타내었다.

β -Carotene 퇴색을 이용한 제주도에서 수집된 propolis의 항산화 활성을 분석한 결과, 북제주 노형(J2)에서 수집된 propolis가 25.4%로 가장 높은 활

성을 나타내었고, 북제주 한림(J5)에서 수집된 propolis가 8.6%로 가장 낮은 antioxidant activity를 나타내었다. DPPH free radical 소거활성을 이용하여 측정한 제주도산 propolis의 항산화 능력은 북제주 노형(J2)에서 수집된 propolis가 26.7%로 합성 항산화제인 BHT와 비슷한 높은 항산화 활성을 나타내었으며, 남제주 표선(J4)에서 수집된 propolis가 6.2%로 가장 낮은 DPPH free radical-scavenging activity를 나타내었다. ABTS radical cation-scavenging activity 측정 결과 또한 북제주 노형(J2)에서 수집된 propolis가 47.2%로 BHT와 비슷한 정도의 항산화 활성을 나타내었고, 북제주 한림(J5)에서 수집된 propolis가 17.2%로 가장 낮은 ABTS radical cation-scavenging activity를 나타내었다. 그리고 제주도산 propolis의 FRAP activity를 분석한 결과 6 개의 propolis 모두 BHT보다 높은 FRAP activity를 나타내었다.

제주도산 propolis의 조성성분에 따른 antibacterial 및 antifungal activity를 HPTLC/bioautography 방법으로 평가한 결과, gram-positive bacteria의 항균 활성은 *B. cereus*에서 최소 2 개에서 최대 8 개, *L. monocytogenes*에서 최소 2 개에서 최대 7 개, *S. aureus*에서 최소 1 개에서 최대 3 개의 antibacterial band가 관찰되었다. 그러나 gram-negative bacteria인 *E. coli*, *V. parahaemolyticus*, *S. typhimurium*에서는 antibacterial band를 확인할 수 없었으며, mold인 *A. niger*, *A. oryzae*, *P. chrysogenum*에서도 antifungal band를 전혀 확인할 수 없었다.

주요어 : Propolis, Total polyphenol, Flavonoid, Antioxidant activity, Antibacterial activity, Antifungal activity, HPTLC

목 차

I. 서 론	1
II. 실험재료 및 방법	4
1. 실험재료	4
1.1. 재료	4
1.2. Propolis 추출물 조제	4
1.3. 시약	4
1.4. 사용균주 및 배지	6
2. 실험방법	8
2.1. 페놀성 화합물(polyphenol compound) 분석	8
2.1.1. Total polyphenol 함량 측정	8
2.1.2. Total flavonoid 함량 측정	8
2.2. High performance thin-layer chromatography(HPTLC) plate 전 개 및 구성성분 확인	8
2.3. Antioxidant activity	9
2.3.1. Antioxidant activity on linoleic acid oxidation	9
2.3.2. Free radical-scavenging activity on DPPH	9
2.3.3. Scavenging activity of ABTS radical cation	10
2.3.4. FRAP assay	10
2.3.5. Antioxidant activity on HPTLC plate	11
2.4. Antibacterial activity on HPTLC plate	12
2.5. Antifungal activity on HPTLC plate	12

III. 결과 및 고찰	13
1. 페놀성 화합물(polyphenol compound) 분석	13
1.1. Total polyphenol 함량 및 flavonoid 함량	13
2. 제주도산 propolis의 HPTLC pattern	16
3. Antioxidant activity	20
3.1. Effects of Jeju island propolis on linoleic acid oxidation	20
3.2. DPPH radical-scavenging activity of Jeju island propolis	23
3.3. Effects of Jeju island propolis on ABTS radical cation	27
3.4. FRAP activity of Jeju island propolis	30
3.5. Inhibiting ability of soybean oil on HPTLC	34
4. Antibacterial activity on HPTLC plate	38
4.1. Gram-positive bacteria에 대한 억제능력	38
4.2. Gram-negative bacteria에 대한 억제능력	41
5. Antifungal activity on HPTLC plate	43
IV. 요 약	45
참고문헌	47
ABSTRACT	53

List of Tables

Table 1. List of strains and media used for antibacterial and antifungal experiments	7
Table 2. Total polyphenol and flavonoid contents of Jeju island propolis	14



List of Figures

Figure 1. Collection sites of Jeju island propolis	5
Figure 2. High performance thin-layer chromatograms of major standard substances of propolis	17
Figure 3. HPTLC patterns of Jeju island propolis	18
Figure 4. Antioxidant activity of Jeju island propolis in the β -carotene-linoleic acid system	21
Figure 5. Relation between antioxidant activity of EEP and contents of polyphenol	22
Figure 6. DPPH free radical-scavenging activity of Jeju island propolis	24
Figure 7. Relation between DPPH free radical-scavenging activity of EEP and contents of polyphenol	25
Figure 8. ABTS radical cation-scavenging activity of Jeju island propolis	28
Figure 9. Relation between ABTS radical cation-scavenging activity of EEP and contents of polyphenol	29

Figure 10. FRAP activity of Jeju island propolis	31
Figure 11. Relation between FRAP activity of EEP and contents of polyphenol	32
Figure 12. Antioxidant activity of major standard substances of propolis on HPTLC plate	35
Figure 13. Antioxidant activity of EEP on HPTLC	36
Figure 14. Antibacterial component of propolis against (a) <i>B. cereus</i> , (b) <i>L. monocytogenes</i> , and (c) <i>S. aureus</i> on HPTLC gel	39
Figure 15. Antibacterial component of propolis against (a) <i>E. coli</i> , (b) <i>S.</i> <i>typhimurium</i> , and (c) <i>V. parahaemolyticus</i> on HPTLC gel	42
Figure 16. Antifungal component of propolis against (a) <i>A. niger</i> , (b) <i>A.</i> <i>oryzae</i> , and (c) <i>P. chrysogenum</i> on HPTLC gel	44

I. 서 론

Propolis란 꿀벌이 유해한 세균이나 바이러스로부터 벌집을 보호하고 청결한 환경을 유지하기 위하여, 식물의 잎, 꽃, 봉오리, 나무 등에서 분비되는 수액 및 왁스 성분과 꿀벌의 타액 및 분비물을 혼합하여 만든 점착성을 가진 수지성 물질이다^{1,2)}. 꿀벌은 propolis를 소방 사이나 벌통 안 틈새에 발라 벌집 전체의 구조를 보강하고, 특히 여왕벌이 산란하기 전에 미리 propolis를 소방에 coating함으로서 미생물로부터 알과 유충을 안전하게 보호하는 역할을 한다³⁾.

이러한 propolis는 고대부터 민간약재로 사용되어 왔으며, 이집트, 아랍, 그리스 등 여러 나라에서도 사용되어 왔다⁴⁾. 고대 이집트에서는 사체를 미이라로 만드는 과정에 propolis를 사용하였고, 기원전 4세기 경 Aristotle의 저서 ‘동물지’에서는 상처를 치료하거나 피부질환에 사용했다고 기록되어 있으며, 기원전 1세기 경 Pliny의 저서 ‘Historia naturalis’에서는 농양 치료, 신경통 해소, 부종 억제 등의 치료제로 이용하였다고 보고되어 있다^{5,6)}. 이러한 propolis는 항산화, 항균, 항바이러스, 항증식, 항고혈압 및 항암 등의 다양한 생리활성이 보고되어 있으며, 현재는 면역, 심장질환, 당뇨 및 여러 암과 같은 질병을 예방하거나 건강을 향상시키기 위한 건강기능·보조식품으로 많이 이용되고 있다⁷⁾.

Propolis는 수집되는 지역에 따른 차이는 있으나 일반적으로 50%의 수지 성분, 30%의 wax, 10%의 정유 및 방향유, 5%의 화분, 그리고 5%의 기타 다양한 성분으로 이루어져 있다²⁾. Propolis에서 실제로 이용되는 부분은 alcohol과 같은 유기용매에서 추출되는 성분으로, 이러한 추출물로부터 많은 화합물이 분리·동정되었고 그 중에서 가장 중요한 성분이 flavonoid와 다양한 종류의 phenolics, 그리고 방향성 물질이며, 이러한 성분들은 대부분 수지 성분에 다량 함유되어 있다⁹⁾. 이러한 propolis는 수집되는 지역의 기후, 식생, 계절 등에 따라 구성성분 조성에 차이가 있는 것으로 알려져 있으며, 수집되는 지역 및 구성성분에 따라 ‘Poplar type’과 ‘Baccahris type’으로 크게 두 타입으로 분류된다^{8,9)}. 유럽과 몇몇 열대지역을 제외한 아시아산 propolis

가 대표적인 'Poplar type' propolis이며, 주된 식생은 *Populus nigra*이고 그 주요 구성성분은 flavones과 phenolic acid 및 esters이다. 그리고 'Baccharis type' propolis는 브라질에서 수집되는 propolis로서, *Baccharis dracunculifolia*가 주된 식생이고 *p*-coumaric acid 유도체가 주요 성분인 것으로 알려져 있다^{10,11)}.

현재 propolis를 연구하는 국내 연구자 수는 대단히 적고 미흡한 수준으로, 국내산 propolis의 성분과 기능에 대하여 일부 밝혀지고 있으나 아직 상세한 구성성분, 생리활성, 지역별 특성 및 기원식물 등 불분명한 사항이 많다. Ahn 등¹²⁾은 국내 6 개 지역으로부터 propolis를 수집하여 구성성분 및 항산화 활성을 분석한 결과, 높은 항산화 활성을 가지는 것을 확인하였으며 한국산 propolis는 Poplar type인 것으로 보고하였다. 또한, Choi 등¹³⁾은 국내 4 개 지역에서 수집된 propolis의 항산화 및 항미생물 활성을 분석한 결과, 국내산 propolis가 브라질산 propolis보다 높은 항산화 및 항미생물 활성을 가지는 것으로 보고한 바 있으며, 허 등¹⁴⁾도 제주도를 제외한 국내 18 개 지역에서 수집된 propolis가 수집지역에 따른 차이는 존재하지만 다른 나라에서 수집된 propolis에 비하여 다소 높은 항균 및 내성균 억제활성을 가지는 것을 확인하였다. Kumazawa 등¹⁵⁾은 제주도에서 수집된 propolis가 기타 다른 지역에서 수집된 propolis와 성분조성에 차이가 있음을 확인하였고 그 시료로부터 분리·동정한 신규 화합물질을 보고한 바 있으나, 현재 제주도에서 수집되는 propolis의 이용은 매우 낮은 실정이며 그 생리활성에 관한 연구 또한 전무하다.

제주도는 한반도 남서쪽에 있는 섬으로, 한라산을 중심으로 동서사면은 3~5°로 완만한 경사이나 남북사면은 5°로 다소 급한 경사를 이루고 있다. 또한 다양한 지형과 지질, 기후조건, 그리고 아열대와 온·한대식물들이 다양한 식물 분포를 형성하고 있으며, 이러한 특성에 따라 제주도에서 분포하는 여러 식물에 관한 연구는 과거부터 활발히 이루어져 왔다. Propolis는 수집되는 지역의 기후, 식생, 지리적 요건 등에 따라 구성성분 및 생리활성의 차이가 나는 것으로 보고된 바, 아열대성 기후를 가지는 제주도에서 수집된 propolis의 경우 한반도에서 수집된 propolis와 다소 다른 경향의 구성성분과 생리활성을 나타낼 것으로 예상된다. 따라서 본 연구는 국내산 propolis에

대한 체계적 연구와 효용가치를 높이기 위한 기초자료를 제공하고자 계획되었으며, 특히 국내 제주도에서 수집된 propolis의 생산지역에 따른 특성과 항산화, 항균 및 항곰팡이 활성 등의 기능성에 대하여 평가하여 보고자 실시하였다.



II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

1.1. 재료

본 실험에 사용한 propolis는 2010년부터 2011년 사이에 생산된 것으로 제주도 6 개의 양봉농가로부터 수집하였다(Fig. 1). Propolis 원괴(crude propolis)는 벌통 내부의 보온 덮개 밑에 나일론사로 제작된 방충망을 설치하여 수집하였으며, 수집한 방충망은 냉동실에 24 시간 방치한 후 부착된 propolis 원괴를 분리하고 꿀벌의 잔해와 이물질을 제거한 후 냉동보관 하였다.

1.2. Propolis 추출물 조제

Propolis는 암소·냉동(-20℃) 보관된 propolis 원괴 20 g에 ethanol 80 ml를 가하여 실온에서 3 일간 교반하면서 추출하였으며, 여과지로 중복 여과한 여액을 농축기(rotary vaccum evaporator, Buchi Rotavapor R-114, Switzerland)를 이용하여 감압농축 하였다. 동결건조(Eyela, FD-5N, Japan)하여 분말화한 propolis를 ethanol에 녹여 2% 및 10% 용액으로 조제(EEP, ethanol extract of propolis)한 것을 본 실험에 사용하였다.

1.3. 시약

본 실험에서 사용한 ferulic acid, o-coumaric acid, p-coumaric acid, kaempferol, naringenin, diphenylboric acid 2-aminoethyl ester, quercetin, α -tocopherol(VE), chrysin, p-iodonitrotetrazolium violet, linoleic acid, 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol(BHT), β -carotene, caffeic acid, 2,4,6-tripyridyl-s-triazine(TPTZ), caffeic acid phenethyl ester(CAPE),



Fig. 1. Collection sites of Jeju island propolis. J1, Bukjeju Aewol; J2, Bukjeju Nohyeung; J3, Namjeju Namwon; J4, Namjeju Pyoseon; J5, Bukjeju Hallim; J6, Bukjeju Hallim.

linoleic acid, ascorbic acid, soybean oil은 Sigma 제품을, cinnamic acid, gallic acid, sodium carbonate, potassium acetate, phenol reagent, iron(III) chloride hexahydrate, potassium peroxodisulfate는 Junsei Chemical 제품을 구입하였다. 그리고 2,2'-azino-bis 3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), galangin은 Fluka-Garanite Chem. 제품을, hesperidin은 Aldrich Chem. 제품을, rutin은 Acros Organics.의 제품을 구입하였다. Tween 40은 Shinyo pure chemical 제품을 구입하였으며, polyethylene glycol, aluminum nitrate는 Yakuri Pure Chemical 제품을, HPTLC plate는 Merk사의 HPTLC plates(10x10 cm, Silicagel 60 F₂₅₄)를 구입하여 사용하였고, 그 외 모든 시약은 특급시약을 사용하였다.

1.4. 사용 균주 및 배지

본 실험에서 사용한 균주는 Gram-positive bacteria인 *Staphylococcus aureus*(KCTC 3881), *Listeria monocytogenes*(KCTC 3710), *Bacillus cereus*(KCTC 1012)와 Gram-negative bacteria인 *Escherichia coli*(KCTC 1923), *Vibro parahaemolyticus*(KCTC 2471), *Salmonella typhimurium* (KCTC 2054), 그리고 mold인 *Aspergillus oryzae*(KCTC 6095), *Aspergillus niger*(KCTC 6196), *Penicillium chrysogenum*(KCTC 6052) 총 9 종으로 한국 생명공학연구소 유전자은행(KCTC, Korea Collection for Type Cultures)으로부터 분양받아 사용하였다(**Table 1**).

실험에 사용한 배지는 *S. aureus*(KCTC 3881), *B. cereus*(KCTC 1012), *E. coli*(KCTC 1923), *S. typhimurium*(KCTC 2054)의 경우 Tryptic Soy broth(Difco, USA) 배지를 사용하였으며, *L. monocytogenes*(KCTC 3710)는 Brain Heart Infusion(Difco, USA) 배지를 사용하였다. 그리고, *V. parahaemolyticus*(KCTC 2471)의 경우 식염 3%를 첨가한 Nutrient broth(Difco, USA) 배지를 사용하였으며, *A. oryzae*(KCTC 6095)와 *A. niger*(KCTC 6196), *P. chrysogenum*(KCTC 6052)의 경우 Potato Dextrin Agar(Difco, USA)를 사용하였다.

Table 1. List of strains and media used for antibacterial and antifungal experiments

Characters	Strain	Media	Temp. (°C)
Gram (+) bacteria	<i>Bacillus cereus</i> (KCTC 1012)	TSA/TSB	30
	<i>Listeria monocytogenes</i> (KCTC 3710)	BHIA/BHIB	37
	<i>Staphylococcus aureus</i> (KCTC 3881)	TSA/TSB	37
Gram (-) bacteria	<i>Escherichia coli</i> (KCTC 1923)	TSA/TSB	37
	<i>Salmonella typhimurium</i> (KCTC 2054)	NA/NB	37
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (KCTC 2471)	NA/NB	30
Molds	<i>Aspergillus niger</i> (KCTC 6196)	PDA	30
	<i>Aspergillus oryzae</i> (KCTC 6095)	PDA	30
	<i>Penicillium chrysogenum</i> (KCTC 6052)	PDA	30

2. 실험방법

2.1. 페놀성 화합물(polyphenol compound) 분석

2.1.1 Total polyphenol 함량 측정

Total polyphenol의 함량은 Folin-Denis법을 변형하여 측정하였다^{16,17)}. EEP 용액 0.5 ml에 10% Folin-Ciocalteu reagent 희석액 0.5 ml를 첨가하여 실온에 3 분간 방치하고, 10% sodium carbonate(Na_2CO_3) 0.5 ml를 첨가 · 혼합하여 실온에서 1 시간 방치한 후 분광광도계(Spectrophotometer, OPTIMA)를 사용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 표준 물질로 표준곡선을 작성하여 비색정량 하였으며, 농도는 건조된 propolis 무게 당 정량된 total polyphenol 무게로 환산하였다.

2.1.2. Total flavonoid 함량 측정

Total flavonoid 함량은 Woisky와 Salatino의 방법에 따라 측정하였다¹⁸⁾. EEP 0.5 ml에 2% AlCl_3 0.5 ml를 첨가하여 실온에서 1 시간 방치한 후, 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. Quercetin을 표준물질로 표준곡선을 작성하여 비색정량 하였으며, 농도는 건조된 propolis 무게 당 정량된 total flavonoid 무게로 환산하였다.

2.2. High performance thin-layer chromatography(HPTLC) plate

전개 및 구성성분 확인

HPTLC plate 전개는 precoating된 silical gel plate(10x10 cm, Silica gel 60 F254, MERCK)에 Linomat V(CAMAG)를 사용하여 propolis를 점적하였으며, 전개액은 benzene: ethyl acetate: formic acid를 4: 1: 0.5 의 비율로 혼합하여 전개하였다.

Propolis의 flavonoid 및 phenolic 성분 확인은 HPTLC plate에 각 지역별로 추출한 propolis 1 μl 를 3.0 mm band로 점적하여 전개한 후, 1% diphenylboric acid 2-aminoethyl ester와 5% polyethylene glycol을 차례로 분무하고 자외선(365 nm)을 조사하여 확인하였다. Propolis의 주요 구성성분

의 표준물질(standard substance)은 각 성분 0.5 μ l를 2.5 mm band로 점적하여 전개하였다.

2.3. Antioxidant activity

2.3.1. Antioxidant activity on linoleic acid oxidation

β -Carotene의 퇴색을 이용한 항산화능은 Emmons 등의 방법을 이용하여 측정하였다¹⁹⁾. β -Carotene 0.3 mg을 3 ml의 chloroform으로 용해한 후 40 mg의 linoleic acid와 750 mg의 Tween 40을 첨가하고, 질소 가스를 분무하여 chloroform을 모두 제거한 후 증류수 100 ml를 가하여 emulsion 용액을 조제하였다. β -Carotene/linoleic acid emulsion 용액 3 ml에 EEP 50 μ l를 혼합하여 50℃ 항온수조에서 1 시간 동안 반응시킨 후 470 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 EEP 대신 ethanol을 첨가하여 측정하였으며, 아래와 같은 계산식에 의하여 antioxidant activity(%)를 측정하였다. 이 때, 활성의 비교를 위하여 합성 항산화제인 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol(BHT)과 천연 항산화제인 vitamin E(VE)를 EEP 1/10 농도로 첨가한 후 동일한 방법으로 측정하였다.

$$\text{Antioxidant activity(\%)} = (DRc - DRs) / DRc \times 100$$

DRc: Control O.D. ($=\ln(a/b)/60$)

DRs: Sample O.D. ($=\ln(a/b)/60$)

a: 0 min O.D.

b: 60 min O.D.

2.3.2. Free radical-scavenging activity on DPPH

DPPH free radical 소거활성은 EEP 1250 μ l에 0.5 mM DPPH ethanol solution 250 μ l를 첨가하여 어두운 곳에서 1 시간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 EEP 대신 ethanol을 첨가하여 측정하였으며, 대조구에 대한 흡광도의 감소 차를 이용하여 DPPH free

radical-scavenging activity(%)를 산출하였다. 천연 항산화제인 VE와 합성 항산화제인 BHT의 DPPH free radical-scavenging activity(%)를 측정하여 propolis의 활성을 비교·분석하였다.

$$\text{DPPH free radical-scavenging activity(\%)} = (A_c - A_s) / A_c \times 100$$

A_c : Control O.D.

A_s : Sample O.D.

2.3.3. Scavenging activity of ABTS radical cation

ABTS의 측정은 Fellegrini 등의 방법을 변형하여 측정하였다²⁰⁾. 7 mM ABTS 5 ml와 140 mM potassium peroxodisulfate($K_2S_2O_8$) 88 μ l를 혼합하여 암실에서 12~16 시간 방치한 용액 1 ml에 ethanol 88 ml를 첨가하여 ABTS $^{\cdot+}$ 용액을 조제하였으며, ABTS $^{\cdot+}$ 용액의 농도가 734 nm에서 흡광도 0.70 ± 0.02 가 되도록 ethanol로 희석한 후 사용하였다. ABTS $^{\cdot+}$ 용액 990 μ l에 EEP 10 μ l를 첨가하여 30 초간 진탕하고 2.5 분간 실온에서 방치한 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 EEP 대신 ethanol을 첨가하여 측정하였으며, 아래와 같은 계산식에 의하여 ABTS radical inhibition(%)을 측정하였다. 활성의 비교를 위하여 천연 항산화제인 VE와 합성 항산화제인 BHT를 EEP와 동일한 농도로 첨가한 후 같은 방법으로 측정하였다.

$$\text{ABTS radical inhibition(\%)} = (A_c - A_s) / A_c \times 100$$

A_c : Control O.D.

A_s : Sample O.D.

2.3.4 Ferric reducing ability of plasma(FRAP) assay

FRAP assay은 Benizie와 Strain의 방법을 이용하여 측정하였다²¹⁾. 40 mM HCl에 녹인 10 mM 2,4,6-tripyridyl-s-triazine(TPTZ) 2.5 ml에 20 mM Iron(III) chloride hexahydrate($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) 2.5 ml와 0.3 M acetate

buffer(pH 3.6)를 혼합하여 FRAP reagent를 조제하였다. FRAP reagent 3 ml에 EEP 100 μ l를 첨가하여 3 분간 실온에서 방치한 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 아래와 같은 계산식에 의하여 FRAP activity를 측정하였다. 이 때, 활성의 비교를 위하여 천연 항산화제인 VE와 합성 항산화제인 BHT를 EEP와 동일한 농도로 첨가한 후 같은 방법으로 측정하였다.

$$\text{FRAP activity} = A_C/A_A \times 100$$

A_C : Sample O.D.

A_A : Ascorbic acid(100 μ g/ml) O.D.

2.3.5. Antioxidant activity on HPTLC plate

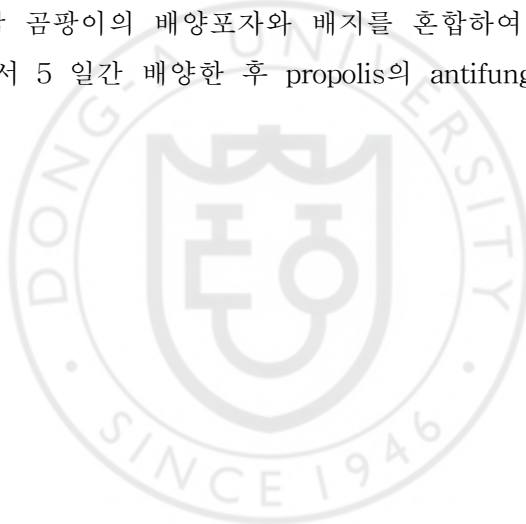
Propolis의 구성성분에 따른 항산화 능력은 HPTLC plate에 각 지역별로 추출한 propolis 1 μ l를 3.0 mm band로 점적하여 전개한 후, 3% soybean oil을 분무하고 단자외선(254 nm)을 조사하여 대두유 산화 억제 band의 지속시간을 측정하였다. 또한 propolis의 주요 구성성분의 표준물질(standard substance)의 경우, 각 성분 0.5 μ l를 3.0 mm band로 점적하여 전개한 후 대두유 산화에 대한 억제 band를 확인하였다.

2.4. Antibacterial activity on HPTLC plate

Propolis 조성성분에 따른 antibacterial activity는 HPTLC/bioautography 방법으로 평가하였다. HPTLC plate에 각 지역별로 추출한 EEP 각각 0.5, 1 μ l를 3.0 mm band로 점적하여 전개한 후, 18~24 시간 배양한 각 균주 배양액과 배지를 혼합하여 1~2 mm 두께로 분주하였다. HPTLC plate를 37°C에 18 시간 배양하고 p-iodonitrotetrazolium violet을 분무하여 1~2 시간 추가 배양한 후 antibacterial band를 확인하였다.

2.5. Antifungal activity on HPTLC plate

HPTLC plate에 각 지역별로 추출한 EEP 3 μ l를 5.0 mm band로 점적하여 전개한 후, 각 곰팡이의 배양포자와 배지를 혼합하여 1~2 mm 두께로 분주하고 30°C에서 5 일간 배양한 후 propolis의 antifungal band를 확인하였다.



III. 결과 및 고찰

1. 페놀성 화합물(polyphenol compound) 분석

1.1 Total polyphenol 함량 및 flavonoid 함량

Folin-Ciocalteu 분석법은 식물과 같이 polyphenol 함량이 많은 샘플을 측정하기에 적합한 방법으로, 일반적으로 총 polyphenol 함량을 측정하는데 널리 사용되고 있다. $AlCl_3$ 방법은 물질의 B 또는 C 고리에 존재하는 catecholic 및 특정 hydroxylation에서만 flavonoid가 확인되므로 총 flavonoid 함량을 정확하게 확인할 수 없는 단점을 지니고 있으나, 현재 총 flavonoid 함량을 측정하는 실험법으로 가장 널리 사용되고 있는 실험방법이다.³⁰⁾

제주도에서 수집된 각 지역별 propolis의 총 polyphenol 함량 및 flavonoid 함량은 **Table 2**와 같다. 제주도산 propolis의 총 polyphenol 함량은 평균 79.4 mg/g of EEP이며, 북제주 노형(J2)에서 수집된 propolis가 126.8 mg/g of EEP로 가장 높은 함량을 나타내었다. 그러나 남제주 남원(J3)과 북제주 한림(J5)에서 수집된 propolis의 총 polyphenol 함량은 70.0 mg/g of EEP 이하로 다소 낮은 함량을 나타내었으며, 특히 북제주 한림(J5)에서 수집된 propolis의 경우 59.7 mg/g of EEP로 가장 낮았다.

제주도에서 수집된 propolis의 총 flavonoid 함량은 평균 58.4 mg/g of EEP로 남제주 표선(J4)에서 수집된 propolis가 108.8 mg/g of EEP로 가장 높은 함량을 나타내었으며, 북제주 애월(J1)에서 수집된 propolis가 42.1 mg/g of EEP로 가장 낮은 총 flavonoid 함량을 나타내었다.

Hamasaka 등²²⁾은 일본 여러 지역에서 수집된 propolis를 분석한 결과, 총 polyphenol 및 flavonoid 함량이 각각 53.3~431.2 mg/g of EEP, 21.0~113.1 mg/g of EEP 함유되어 있는 것으로 보고하였으며, Bonvehí 등²³⁾은 스페인 북동부에서 수집된 propolis를 분석한 결과 총 polyphenol 및 flavonoid 함량이 각각 210~340 mg/g of EEP, 86~161 mg/g of EEP로 보고하였던 바, 제주도에서 수집된 propolis의 총 polyphenol 및 flavonoid 함량은 이들의 결

Table 2. Total polyphenol and flavonoid contents of Jeju island propolis

Sample No.	Collecting site	Total polyphenol ^a	Total flavonoid ^b
		(mg/g of EEP)	(mg/g of EEP)
J1	BukJeju Aewol	78.4±3.9	42.1±1.1
J2	BukJeju Nohyeung	126.8±3.4	48.7±1.1
J3	Namjeju Namwon	62.7±3.2	53.3±0.0
J4	Namjeju Pyoseon	75.5±1.9	108.8±4.5
J5	BukJeju Hallim	59.7±3.2	53.1±2.0
J6	BukJeju Hallim	73.1±2.6	44.5±2.7

^aTotal polyphenol contents were determined by the Folin-Ciocalteu method. Each value is the mean±standard deviation.

^bFlavonoid contents were determined by AlCl₃ coloration. Each value is the mean±standard deviation.

과와 비교하여 볼 때 다소 낮은 함량을 나타내는 것을 확인할 수 있다. 또한, Silva 등⁹⁾은 우르과이산 propolis의 총 polyphenol 및 flavonoid 함량을 분석한 결과 각각 33.0~176.0 mg/g of EEP와 4.0~54.0 mg/g of EEP로 보고하였으며, Isla 등²⁴⁾은 아르헨티나에서 수집된 propolis의 총 flavonoid 함량이 13.3~62.0 mg/g of EEP로 보고한 바 있다. 기존에 발표된 연구결과와 본 연구에서 사용된 제주도산 propolis를 비교하여 볼 때, 총 polyphenol 함량은 우르과이산 propolis가 제주도산 propolis보다 높은 함량을 가지는 것으로 확인되었으나, 총 flavonoid 함량은 우르과이산 및 아르헨티나산 propolis보다 제주도산 propolis가 높은 함량을 가지는 것을 확인할 수 있었다.

또한, Kalogeropoulos 등²⁵⁾은 Greece와 Cyprus를 포함한 여러 지역으로부터 수집한 propolis의 총 polyphenol 함량을 분석한 결과 80.2~338.5 mg/g of EEP로서, 시료 중 특히 지중해성 기후의 Cyprus에서 수집된 propolis가 다른 지역에서 수집된 propolis에 비하여 총 polyphenol 함량이 80.2, 85.7 mg/g of EEP로 다소 낮은 것을 확인하였던 바, 제주도에서 수집된 propolis에서 이와 비슷한 수준의 polyphenol 함량을 나타내는 것은 수집된 지역적 차이로 보여진다. 각 나라별 또는 지역별 propolis의 총 polyphenol 및 flavonoid 함량의 차이는 propolis의 품질을 결정하는데 중요한 요소로 추정되며 이는 propolis의 가격과 생산량 등 많은 영향을 미칠 것으로 사료된다. 따라서 남제주 표선(J4)에서 수집된 propolis의 총 flavonoid 함량이 총 polyphenol 함량보다 높게 나타난 결과는 남제주 표선(J4)에서 수집된 propolis가 다른 지역에서 수집된 propolis와 상이한 구성성분을 가지고 있거나 특이적인 결과로 판단되며, 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

2. 제주도에서 수집된 propolis의 HPTLC pattern 및 구성성분

제주도에서 수집된 propolis의 flavonoid 및 phenolic 성분 확인은 high performance thin-layer chromatography(HPTLC)를 이용하여 분석하였다. **Fig. 2**는 propolis의 주요 구성성분의 표준물질(standard substance)을 전개한 것으로 chrysin, galangin, kaempferol, quercetin 등과 같은 flavonoid 물질은 황갈색 계통의 색을 나타내었으며, caffeic acid, cinnamic acid, coumaric acid, ferulic acid 등과 같은 phenolic acid 물질은 청남색 계통의 색을 나타내었다.

제주도에서 수집된 propolis의 HPTLC pattern을 분석하여 본 결과, 최대 15 개의 phenolic acid와 flavonoid band를 확인할 수 있었다(**Fig. 3**). 북제주 애월(J1)과 북제주 노형(J2)에서 수집된 propolis의 경우 다양한 phenolic acid와 flavonoid 성분이 함유되어 있는 것을 확인할 수 있었으나, 다른 지역에서 수집된 propolis(J3~J6)의 경우 이와는 상이한 양상의 band pattern을 나타내었다. 남제주 남원(J3), 남제주 표선(J5) 그리고 북제주 한림(J6)에서 수집된 propolis의 경우, 북제주 애월(J1)과 북제주 노형(J2)에서 수집된 propolis에 비하여 다소 적은 구성성분을 함유하고 있는 것으로 나타났으나 propolis를 구성하는 페놀성 화합물의 종류에는 큰 차이가 없는 것으로 보인다. 그리고 남제주 남원(J3)과 남제주 표선(J5)에서 수집된 propolis의 HPTLC band pattern이 미약하게 나타난 것은 앞서 확인된 총 polyphenol 및 flavonoid의 함량이 낮은 결과와 일치하는 것으로 보이며, 가장 높은 polyphenol 함량을 나타내었던 북제주 노형(J2)에서 수집된 propolis가 가장 많은 band를 가지는 것으로 나타났다. 반면 남제주 표선(J4)에서 수집된 propolis는 다른 지역에서 수집된 propolis(J1~J3, J5, J6)와 달리 청남색 계통의 band가 매우 강하게 나타났으며 황갈색 계통의 band는 미약하였고, 다른 지역에서 수집된 propolis의 HPTLC pattern과 비교하여 볼 때 상당한 차이가 있음을 확인할 수 있다.

Gregoris 등²⁶⁾은 베네치아에서 수집된 propolis의 주요 구성성분이 pinocembrin, caffeic acid phenethyl ester와 galangin인 것을 확인하였으며, 특히 Poplar type propolis의 경우 caffeic acid, *p*-coumaric acid, ferulic

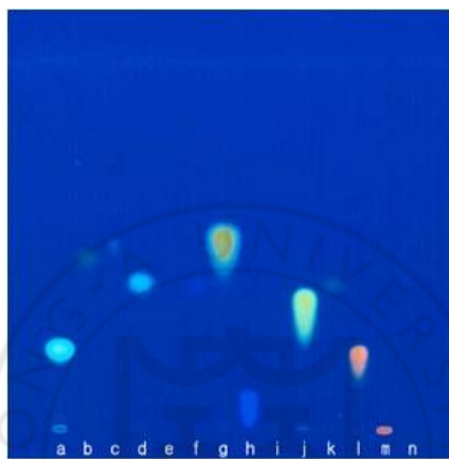


Fig. 2. High performance thin-layer chromatograms of major standard substances of propolis. a, caffeic acid; **b,** chrysin; **c,** cinnamic acid; **d,** o-coumaric acid; **e,** p-coumaric acid; **f,** ferulic acid; **g,** galangin; **h,** gallic acid; **i,** hesperidin; **j,** kaempferol; **k,** naringenin; **l,** quercetin; **m,** rutin; **n,** vanillin.

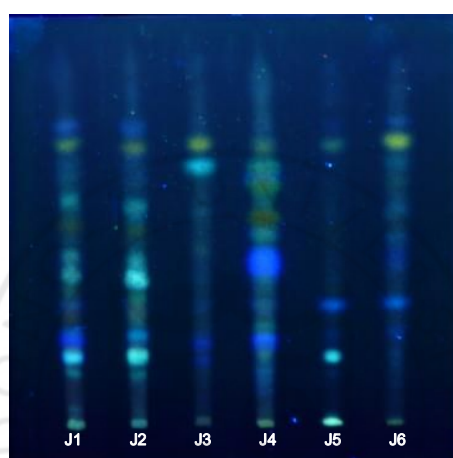


Fig. 3. HPTLC patterns of Jeju island propolis. J1; Bukjeju Aewol, **J2;** Bukjeju Nohyeung, **J3;** Namjeju Namwon, **J4;** Namjeju Pyoseon, **J5;** Bukjeju Hallim, **J6;** Bukjeju Hallim.

acid, kaempferol 및 pinostrobin 등이 그 주요 구성성분이라고 보고하였다²⁷⁾. 지금까지 지리적 위치에 따른 propolis 구성성분에 대한 많은 연구가 꾸준히 이루어져 왔으며, 그 결과 Lima 등²⁸⁾은 아르헨티나산 propolis의 주요 구성성분이 pinocembrin, pinobanksin, chrysin 및 galangin인 것을 확인하였고, Watson 등²⁹⁾도 불가리아, 중국, 포르투갈 및 영국에서 수집된 propolis를 분석한 결과 caffeic acid, pinocembrine, chrysin이 그 주요 구성성분임을 밝혀내었다. 뿐만 아니라, Sulaiman 등³⁰⁾은 이라크산 propolis의 주요 구성성분이 caffeic acid, ferulic acid와 prenyl caffeate와 같은 phenolic acid와 pinocembrin, luteolin, chrysin, galangin과 같은 flavonoids로 보고한 바 있으며, 특히 Ahn 등¹²⁾은 한국에서 수집된 propolis로부터 caffeic acid, *p*-coumaric acid, kaempferol 등 15 개의 polyphenol 및 flavonoid 구성성분이 함유되어 있는 것을 밝혀내었다. 제주도에서 수집된 propolis의 구성성분 확인은 HPTLC를 이용하여 신속하고 간단하게 평가할 수 있었으며, 그 결과 특이적 구성성분을 함유한 것으로 확인된 남제주 표선(J4)에서 수집된 propolis의 성분분석에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

3. Antioxidant activity

3.1 Effects of Jeju island propolis on linoleic acid oxidation

β -Carotene의 퇴색을 이용한 항산화능은 β -carotene과 linoleic acid가 반응하여 β -carotene의 주황색이 퇴색되는 특성을 이용한 것으로, 항산화 활성을 가지는 시료를 첨가함에 따라 β -carotene 퇴색의 정도를 확인하여 분석하는 방법이다. 이러한 β -carotene-linoleic acid system을 이용한 제주도산 propolis의 항산화능 분석 결과는 **Fig. 4**와 같다.

제주도에서 수집된 propolis의 antioxidant activity(%)는 8.6~25.4%로 총 polyphenol 함량이 가장 높게 나타났던 북제주 노형(J2)에서 수집된 propolis가 25.4%로 가장 높은 활성을 나타내었고, 총 polyphenol 함량이 가장 낮게 확인되었던 북제주 한림(J5)에서 수집된 propolis가 8.6%로 가장 낮은 antioxidant activity(%)를 나타내었다. 제주도에서 수집된 propolis의 항산화 활성과 total polyphenol 함량과의 상관관계를 살펴본 결과 상관계수 R^2 은 0.797로 높게 나타났으며, 제주도에서 수집된 propolis의 항산화 활성에는 polyphenol류의 기여가 큰 것으로 추측된다(**Fig. 5**).

Kumazawa 등¹⁾은 세계 각 국으로 부터 수집된 propolis의 항산화 활성을 측정 한 결과, 아르헨티나, 중국, 헝가리 등에서 수집된 propolis는 60% 이상의 항산화 활성을 나타내었으며, 남아프리카, 미국과 우즈베키스탄에서 수집된 propolis의 경우 약 30%, 그리고 태국에서 수집된 propolis는 항산화 활성이 거의 나타나지 않았다고 보고한 바, 제주도에서 수집된 propolis는 태국산 propolis보다 높은 항산화 결과를 나타내었으며, 남아프리카와 미국, 우즈베키스탄에서 수집된 propolis와는 비슷한 활성을 나타내었다. 또한 Hamasaka 등¹⁹⁾은 일본의 13 개 지역에서 수집된 propolis의 항산화 활성을 확인한 결과 β -carorene 퇴색억제능은 약 10~60%로 보고하였으며, 아키타, 후쿠시마, 카나가와 그리고 후쿠오카에서 수집된 propolis의 경우 10~20%로 보고하였던 바 이들 propolis는 제주도에서 수집된 propolis와 비슷한 정도의 항산화 활성을 가지는 것을 확인할 수 있다.

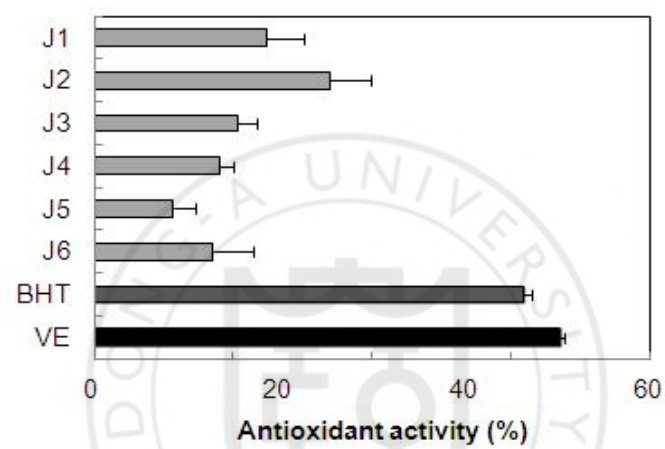


Fig. 4. Antioxidant activity of Jeju island propolis in the β -carotene-linoleic acid system.

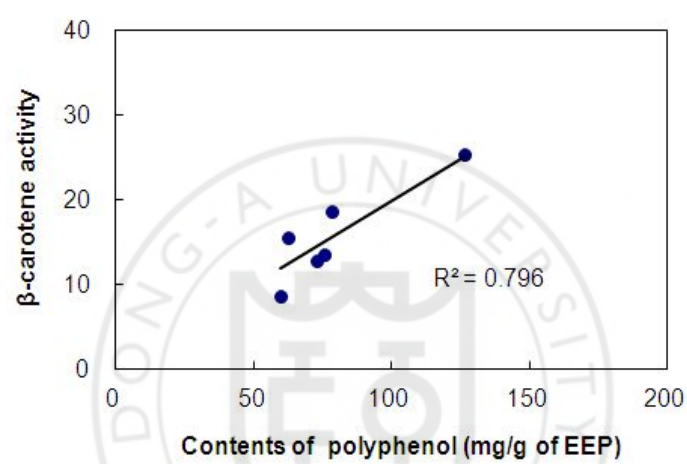


Fig. 5. Relation between antioxidant activity of EEP and contents of polyphenol.

3.2 DPPH free radical-scavenging activity of Jeju island propolis

DPPH는 실온에서 안정한 상태로, 에탄올에 녹일 경우 보라색을 띄고 515 nm 상에서 특정한 흡광도를 보이며 항산화활성을 가지는 시료에 의하여 특유의 색인 보라색이 없어지면서 흡광도가 낮아지게 된다. 이러한 DPPH free radical 소거능은 쉽고 간단하게 항산화 활성을 평가할 수 있으므로 항산화 활성평가 시 보편적으로 사용되고 있는 실험법이다.

제주도에서 수집된 propolis의 DPPH free radical-scavenging activity(%) 결과는 **Fig. 6**과 같다. 제주도에서 수집된 propolis는 6.2~26.7%로 북제주 노형(J2)에서 수집된 propolis가 26.7%로 가장 높은 활성을 나타내었으며, 남제주 표선(J4)에서 수집된 propolis가 6.2%로 가장 낮은 DPPH free radical 소거활성을 나타내었다. 특히, 북제주 노형(J2)에서 수집된 propolis의 경우, positive control로 사용된 합성항산화제인 BHT와 비슷한 높은 항산화 활성을 가지는 것을 확인할 수 있었으며, 제주도에서 수집된 propolis의 DPPH free radical-scavenging activity(%)와 total polyphenol 함량과의 상관관계를 살펴본 결과 상관계수 R^2 은 0.661로 나타났다(**Fig. 7**).

Kumazawa 등¹⁾은 propolis의 주요 구성성분에 따른 DPPH free radical 소거활성을 분석한 결과 caffeic acid, quercetin, kampferol, caffeate phenethyl, cinnamyl caffeate, artepillin C의 경우 VE와 비슷한 정도의 높은 항산화 활성을 가지는 것으로 보고한 바, 제주도에서 수집된 propolis는 다른 여러 나라에서 수집된 propolis에 비하여 항산화 활성을 나타내는 구성성분의 함유량이 다소 낮을 것으로 예상된다. Lima 등²⁷⁾은 아르헨티나의 6 개 지역에서 수집된 propolis가 46.6~89.5%의 항산화 활성을 나타내는 것으로 보고하였으며, da Silva 등³²⁾은 브라질산 propolis의 DPPH free radical 소거활성이 4.2~71.9%로 보고한 바 있다. 그리고 Banskota 등³¹⁾은 브라질, 페루, 뉴질랜드 및 중국에서 수집된 propolis의 DPPH free radical 소거활성을 측정한 결과, 브라질산 및 중국산 propolis의 경우 methanol 추출물이 물 추출물보다 강한 항산화 활성을 나타낸 것에 비하여, 페루산과 뉴질랜드산 propolis의 경우 methanol 추출물보다 물 추출물이 더욱 강한 항산화 활성을 나타내었다고 보고하였다. 또한 Russo 등³²⁾은 칠레산 propolis의 DPPH free radical 소거 활성을 측정한 결과, 농도 의존적으로 소거활성이 증가하였으

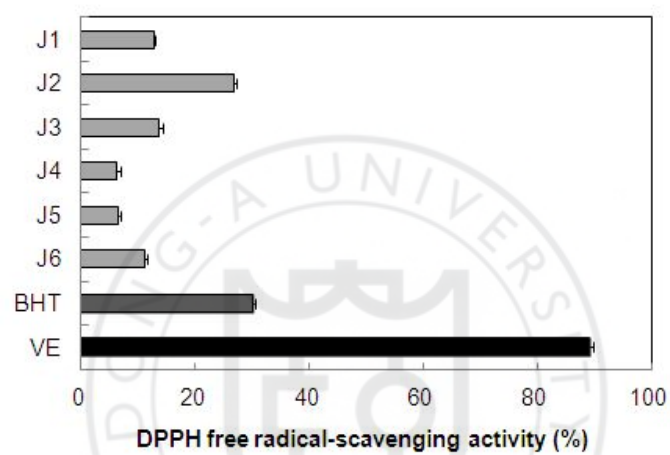


Fig. 6. DPPH free radical-scavenging activity of Jeju island propolis.

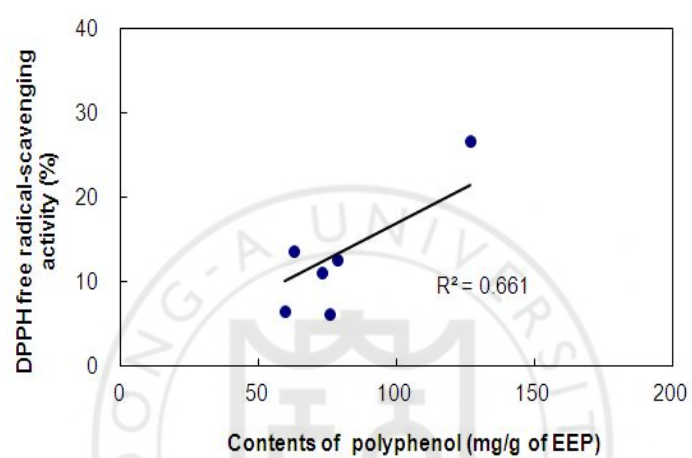


Fig. 7. Relation between DPPH free radical-scavenging activity of EEP and contents of polyphenol.

며 본 실험에 사용된 EEP와 동일한 농도에서 약 20%의 활성을 나타내는 것으로 보고한 바 있다. 이와 같이 제주도에서 수집된 propolis는 다른 지역에서 수집된 propolis에 비하여 다소 낮은 항산화 활성을 가지는 것으로 나타났다으며, 이러한 활성의 차이는 propolis 수집지역에 따른 함유 구성성분과 그 함유량의 차이에 기인된 것으로 사료된다.



3.3 Effects of Jeju island propolis on ABTS radical cation

제주도에서 수집된 propolis의 ABTS radical cation-scavenging activity(%)는 17.2~47.2%로, 총 polyphenol 함량이 가장 높게 나타났던 북제주 노형(J2)에서 수집된 propolis가 47.2%로 가장 높은 활성을 나타내었고, 총 polyphenol 함량이 가장 낮게 나타났던 북제주 한림(J5)에서 수집된 propolis가 17.2%로 가장 낮은 활성을 나타내었다(**Fig. 8**). 북제주 노형(J2)에서 수집된 propolis의 경우 positive control로 사용된 BHT와 비슷한 정도의 항산화 활성을 나타내었으며, 앞서 본 DPPH free radical scavenging activity(%) 결과와 유사한 패턴의 결과를 나타내었다. 제주도에서 수집된 propolis의 ABTS radical cation-scavenging activity(%)와 총 polyphenol 함량과의 상관관계를 살펴본 결과, 상관계수 R^2 은 0.722로 높게 나타났다(**Fig. 9**).

Bonvehí 등²⁴⁾은 스페인 북동부의 20 개 지역에서 수집된 propolis의 ABTS radical 소거활성을 분석한 결과 10.0~52.3%로서 DPPH free radical 소거활성 결과인 8.2~40.5%보다 높은 활성을 나타낸 것으로 보고하였으며, Yang 등³⁴⁾도 중국 안후이에서 수집된 propolis의 ABTS radical 소거활성이 DPPH free radical 소거활성 결과보다 더 높게 나타났다고 보고한 바 있다. 이는 제주도에서 수집된 propolis의 ABTS radical 소거활성 결과가 앞서 확인된 DPPH free radical 소거활성 결과에 비하여 높은 항산화 활성을 가지는 것과 일치한다. Radical 소거활성 결과에 대한 이러한 결과의 차이는 DPPH free radical-scavenging activity의 경우 오직 친유성의 항산화물질과 반응하는 것에 비하여, ABTS radical cation-scavenging activity는 친수성과 친유성 항산화 물질과 모두 반응함에 따라 항산화 활성이 더욱 높게 평가되는 것으로 생각된다³⁵⁾.

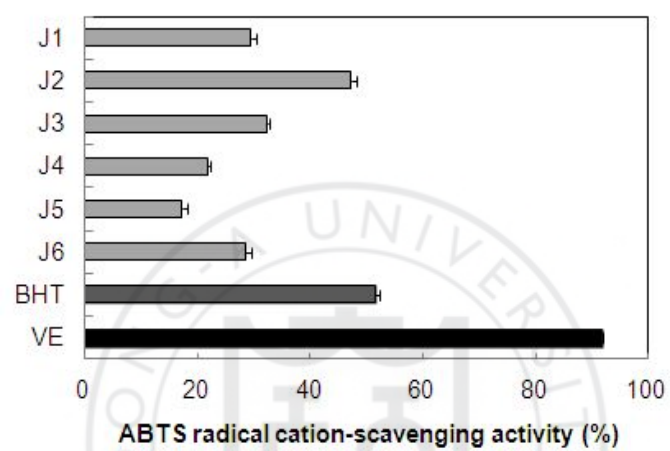


Fig. 8. ABTS radical cation-scavenging activity of Jeju island propolis.

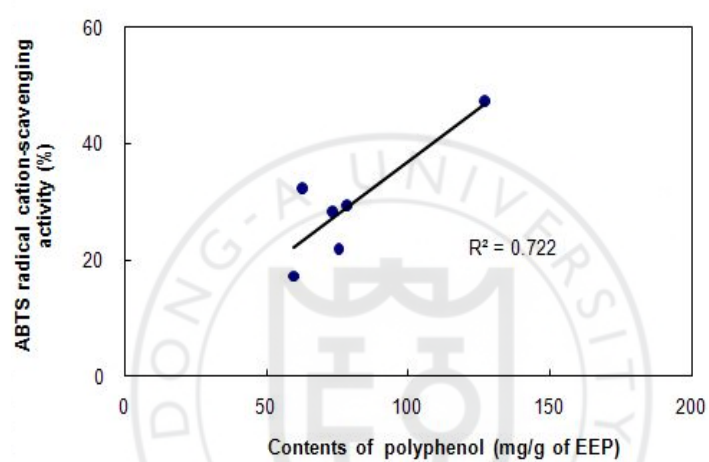


Fig. 9. Relation between ABTS radical cation-scavenging activity of EEP and contents of polyphenol.

3.4 FRAP activity of Jeju island propolis

Ferric reducing ability of plasma(FRAP) 분석법은 colored ferrous tripyridyl triazine complex에 의해 ferric tripyridyltriazine(Fe^{3+} -TPTZ) 복합체가 낮은 pH에서 환원제에 의하여 ferrous tripyridyltriazine(Fe^{2+} -TPTZ)으로 전환되어지는 과정을 분석함으로써 시료 내의 총 항산화 능력을 측정하는 방법이다²¹⁾.

제주도에서 수집된 propolis의 FRAP activity는 46.9~138.2 $\mu\text{g/ml}$ 로, 북제주 노형(J2)에서 수집된 propolis가 138.2 $\mu\text{g/ml}$ 로 가장 높은 항산화 활성을 나타내었으며 남제주 표선(J4)에서 수집된 propolis가 46.9 $\mu\text{g/ml}$ 로 가장 낮은 FRAP activity를 나타내었고, 제주도에서 수집된 6 개의 propolis 모두 positive control인 BHT보다 높은 활성을 나타내었다(**Fig. 10**). 또한 제주도에서 수집된 propolis의 FRAP activity와 total polyphenol 함량과의 상관관계를 살펴본 결과, 상관계수 R^2 은 0.810로 시료에 함유되어 있는 total polyphenol 함량과 매우 높은 상관관계가 있음을 확인하였다(**Fig. 11**).

정 등³⁷⁾은 경남 거창군과 제주도 서귀포시에서 수집된 propolis의 에탄올 및 물 추출물의 항산화 활성을 분석한 결과, 서귀포산 propolis가 거창산 propolis보다 낮은 FRAP 활성을 나타내었으며 물 추출물보다 에탄올 추출물에서 보다 높은 항산화 활성을 가지는 것으로 보고하였다. 그리고 Mohammadzadeh 등³⁶⁾은 이란산 propolis의 FRAP activity를 분석한 결과, 총 polyphenol 함량이 높을수록 FRAP activity 또한 높게 나타난다고 보고하였으며, 이러한 결과는 본 연구결과와 일치하는 것을 확인할 수 있다. 또한 Ahn 등³⁸⁾은 propolis의 주요 구성성분에 따른 FRAP activity를 분석한 결과, artepillin C, *p*-coumaric acid, galangin은 BHT보다 높은 활성을 가지며, caffeic acid phenethyl ester, kaempferol, quercetin 등은 천연 항산화제인 VE보다 높은 활성을 가지는 것으로 보고하였던 바, 제주도에서 수집된 propolis의 구성성분에 대한 체계적인 연구가 더욱 진행되어야 할 것으로 사료된다.

BHA(butylated hydroxyl anisole), BHT, α -tocopherol, propyl gallate 등은 대표적인 합성 항산화제로 상업적으로 많이 이용되고 있으나, 간 손상이나 발암물질 생성과 같이 여러 부정적인 효과를 가지는 것으로 보고되어 있

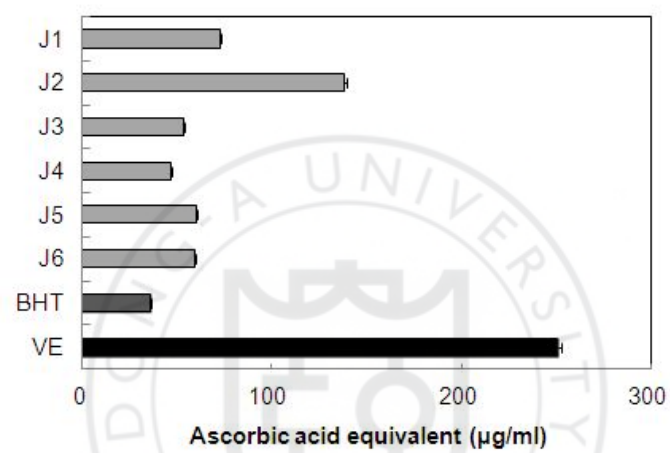


Fig. 10. FRAP activity of Jeju island propolis.

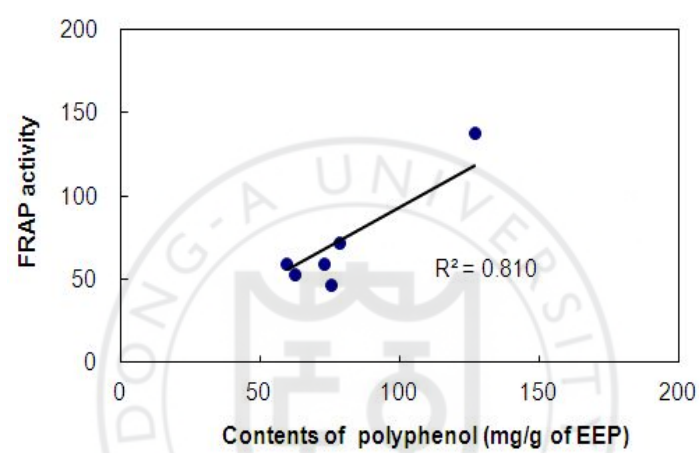


Fig. 11. Relation between FRAP activity of EEP and contents of polyphenol.

다³⁹⁾. 본 실험에 사용된 모든 제주도산 propolis가 합성 항산화제인 BHT보다 높은 항산화 활성을 나타낸 결과로부터 제주도산 propolis는 천연 항산화제로서의 충분한 가능성이 있을 것으로 생각되며 이에 대한 지속적인 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.



3.5 Inhibiting ability of soybean oil on HPTLC

제주도에서 수집된 propolis의 구성성분에 따른 직접적인 항산화 능력을 측정하기 위하여, 그 주요 구성성분의 표준물질(standard substance)을 HPTLC 상에 전개하고 3% soybean oil을 분무한 후 단자외선(254 nm)을 조사하여 산화억제 band를 측정하였다. 전개된 14 개의 표준물질 중 대두유 산화에 있어 억제 band를 나타낸 것은 총 9 개 물질이었으며, galangin, kaempferol, quercetin, rutin, vanillin은 약한 억제 band를 나타내었고 이는 1 시간 이내에 모두 소실되었다(Fig. 12). 그리고 가장 강력한 억제 band를 나타낸 것은 caffeic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, gallic acid로 자외선 조사 후 3 시간이 경과한 후에도 억제 band가 지속되었다.

제주도에서 수집된 propolis의 대두유 산화억제 band는 자외선을 조사한 후 10 분경과 후부터 나타났으며, 70 분경과 후에서 가장 강력한 항산화 활성 band를 확인할 수 있었고, 자외선 조사 100 분경과 후에는 거의 모든 항산화 band가 소실되었다(Fig. 13). 북제주 노형(J2)에서 수집된 propolis의 경우 자외선을 조사한 후 10 분경과 후부터 항산화 band가 나타났으며 가장 강한 항산화 활성을 나타내었고, 북제주 한림(J5)에서 수집된 propolis에서는 다소 약한 억제 band가 관찰되었다. 이는 앞서 본 다양한 실험법의 항산화 활성 결과와 일치하며, 제주도에서 수집된 propolis의 저조한 항산화 능력은 아열대성 기후인 제주 지역의 기후적 특성에 따른 식생의 차이에 기인하는 것으로 보여진다.

한⁴⁰⁾은 식용유지 산화에 대한 propolis의 항산화 효과를 확인한 결과, 유의적으로 식용유지 산화를 억제하는 것을 확인하였으며, 박 등⁴¹⁾은 propolis 추출물 제품이 다른 가공식품에 비하여 원료로부터 기인된 천연유래 보존료인 안식향산과 프로피온산이 비교적 고농도로 함유되어져 있다고 보고한 바 있다. 이러한 결과는 propolis가 화학적 식품보존료를 효과적으로 대체할 수 있을 것으로 보인다. 차 등⁴²⁾도 산화에 민감한 지방 또는 고도불포화지방산 등과 같은 성분들의 산화방지를 위한 propolis 함유 젤라틴 필름이 식품시장에서 고품질 유지 및 안정성 확보를 위한 포장기술로서 가치가 있다고 보고한 바 있다. 제주도산 propolis의 항산화 효과가 식품에 있어 인위적으로 첨가하는 항산화제보다 강한 항산화 효과를 나타내는 것을 볼 때, propolis는

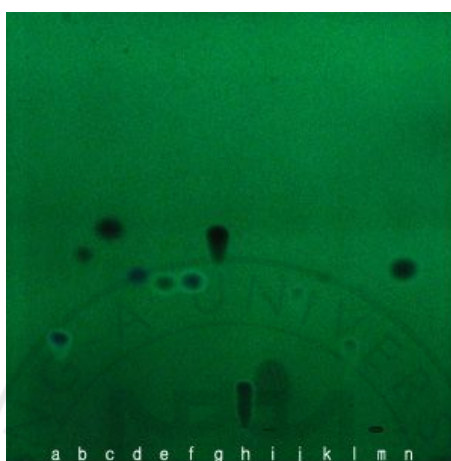


Fig. 12. Antioxidant activity of major standard substances of propolis on HPTLC plate. Observed on HPTLC plate under UV light 20 min after spraying soybean oil. **a**, caffeic acid; **b**, chrysin; **c**, cinnamic acid; **d**, o-coumaric acid; **e**, p-coumaric acid; **f**, ferulic acid; **g**, galangin; **h**, gallic acid; **i**, hesperidin; **j**, kaempferol; **k**, naringenin; **l**, quercetin; **m**, rutin; **n**, vanillin.

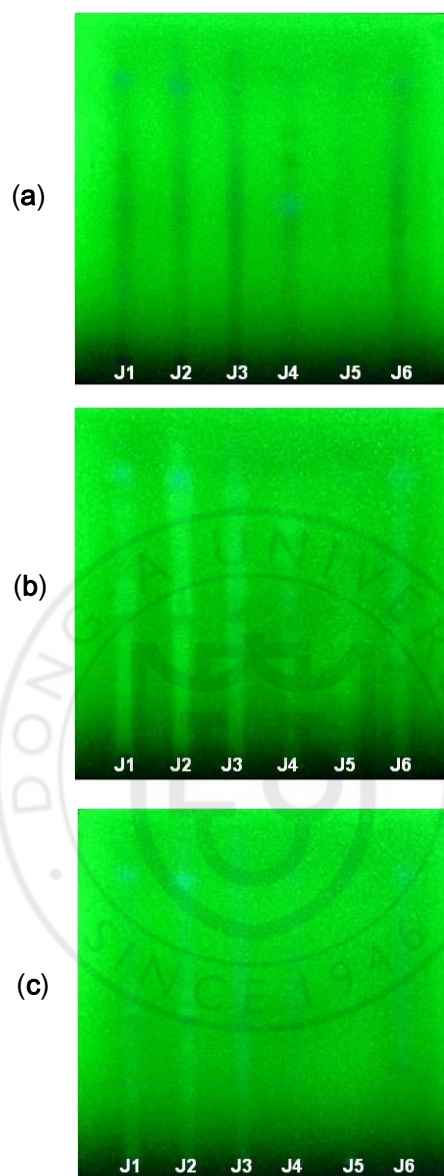


Fig. 13. Antioxidant activity of EEP on HPTLC. Observed on HPTLC plate under UV light (a) 0 min, (b) 60 min, and (c) 130 min after spraying 3% soybean oil.

식용 유지를 포함한 지방 성분들의 산화 방지제로의 이용뿐만 아니라 천연 식품 보존제로서 충분한 가치가 있는 것으로 생각되며 많은 관심과 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.



4. Antibacterial activity on HPTLC plate

4.1. Gram-positive bacteria 억제능력

제주도에서 수집된 propolis의 조성성분에 따른 antibacterial activity를 HPTLC/bioautography 방법으로 평가하여 본 바, gram-positive bacteria인 *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*에 대한 antibacterial activity는 다음과 같다(Fig. 14).

제주도산 propolis의 항균활성은 전반적으로 *S. aureus*와 *B. cereus*에 비하여 *L. monocytogenes*에서 antibacterial band zone이 더욱 크고 다양하게 나타났으며, 수집된 지역과 bacteria의 종류에 따라 다소 다른 양상의 결과를 나타내었다. *B. cereus*에서는 최소 2 개에서 최대 6 개, *L. monocytogenes*에서는 최소 2 개에서 최대 7 개, *S. aureus*에서는 최소 1 개에서 최대 3 개의 antibacterial band를 확인할 수 있었으며, *B. cereus*에 대한 항균 활성의 경우 남제주 표선(J4)과 북제주 한림(J5)에서 수집된 propolis에서 가장 미약하게 나타났다. 그러나 이 두 지역(J4, J5)을 제외한 다른 지역에서 수집된 propolis(J1~J3, J6)의 경우 antibacterial band zone의 위치와 크기가 비슷하였던 바, 제주도산 propolis의 구성성분 중 항균 활성을 나타내는 성분에 대한 지역적 차이는 없는 것으로 판단된다. *L. monocytogenes*에 대한 결과 또한 *B. cereus*의 결과와 유사하게 나타났으며, 남제주 표선(J4)과 북제주 한림(J5)에서 수집된 propolis에서 가장 약한 antibacterial band가 확인되었고, *S. aureus*의 경우 *B. cereus*와 *L. monocytogenes*와는 상이한 결과를 나타내었다. *B. cereus*와 *L. monocytogenes*의 경우 남제주 표선(J4)에서 수집된 propolis가 가장 약한 antibacterial band를 나타내었으나, *S. aureus*에서는 남제주 표선(J4)에서 수집된 propolis에서 가장 많은 antibacterial band를 확인할 수 있었다. 그러나 이를 제외한 다른 지역에서 수집된 propolis(J1~J3, J5, J6)에서는 단 1 개의 antibacterial band가 관찰되었다.

Vardar-Ünlü 등⁴³⁾은 Poplar type propolis의 수종에 따른 antibacterial activity를 확인한 결과 수종에 따라 활성의 차이가 있는 것으로 보고하였으며, propolis가 gram-negative bacterial보다 gram-positive bacterial에서 더

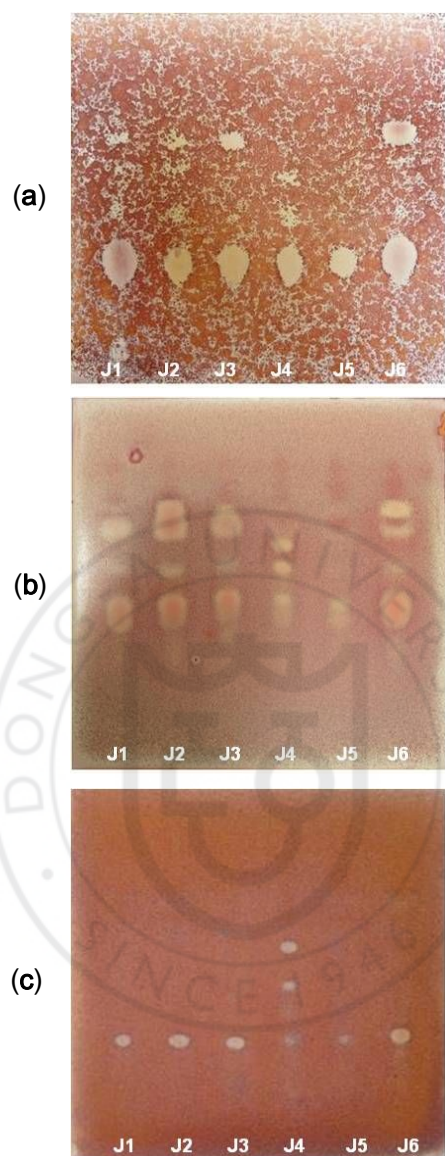


Fig. 14. Antibacterial component of propolis against (a) *B. cereus*, (b) *L. monocytogenes*, and (c) *S. aureus* on HPTLC gel.

강한 항균활성을 가지는 것을 확인한 바 있다. 이로부터 남제주 표선(J4)에서 수집되는 propolis는 다른 지역에서 수집되는 propolis와 달리 항균 활성을 나타내는 특정 성분을 함유하고 있을 것으로 생각되며, 이러한 항균 활성을 가지는 성분에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.



4.2. Gram-negative bacteria 억제능력

제주도에서 수집된 propolis의 조성성분에 따른 antibacterial activity를 HPTLC/bioautography 방법으로 평가한 결과, gram-negative bacteria인 *E. coli*, *V. parahaemolyticus*, *S. typhimurium*에 대한 antibacterial activity는 Fig. 15와 같다.

Gram-negative bacteria에 대한 제주도산 propolis 추출물의 항균활성 실험결과, 앞서 본 gram-positive bacteria 억제능력과 달리 모든 EEP에서 antibacterial band zone이 전혀 확인되지 않았다.

Seidel 등⁴⁴⁾은 아프리카, 남아메리카, 북아메리카, 아시아, 유럽 및 오세아니아로부터 총 40 개의 propolis를 수집하여 항균 활성을 분석한 결과, gram-negative bacteria보다 gram-positive bacteria에서 강한 항균 활성을 나타내는 것을 확인하였으며, 대표적인 gram-negative bacteria인 *E.coli*와 *Ps. aeruginosa*에서는 고농도의 propolis를 첨가한 경우에도 항균 활성을 확인할 수 없었다고 보고하였다. 이러한 bacteria에 대한 항균 활성의 차이는 gram-positive bacteria의 세포벽은 peptidoglycan이 표면에 노출되어 항균 활성 물질의 공격을 받기 쉽지만 gram-negative bacteria는 lipopolysaccharide를 주성분으로 하는 외막이 peptidoglycan을 보호하는 작용에 기인한 것으로 사료된다⁴⁵⁾. 따라서 제주도에서 수집된 propolis의 항생제로서의 효과는 gram-positive 균주에 국한되는 것으로 보인다.

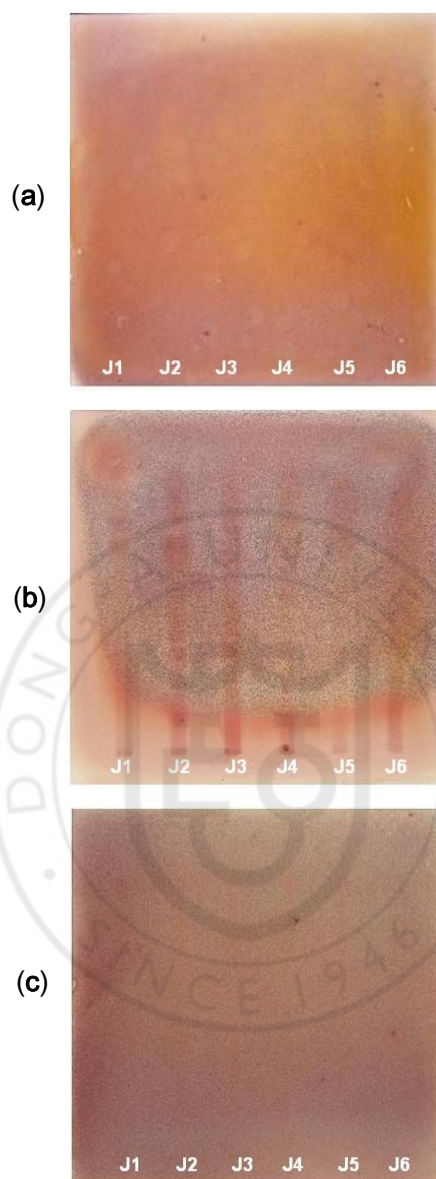


Fig. 15. Antibacterial component of propolis against (a) *E. coli*, (b) *S. typhimurium*, and (c) *V. parahaemolyticus* on HPTLC gel.

5. Antifungal activity on HPTLC plate

제주도에서 수집된 propolis에 대한 항곰팡이 활성을 확인하기 위하여 각 지역별 EEP를 전개한 HPTLC gel에 3 종의 곰팡이(*A. niger*, *A. oryzae*, *P. chrysogenum*) 포자를 배양하여 propolis 구성성분에 따른 antifungal activity를 확인하였다. 그 결과 제주도에서 수집된 propolis(J1~J6)에서는 antifungal band가 전혀 나타나지 않았다(Fig. 16). 이는 박 등⁴⁶⁾이 국내의 18 개 지역에서 수집된 propolis의 항곰팡이 활성을 분석하였던 바 제주도 두 지역에서 수집된 propolis에서만 antifungal band를 확인할 수 없었다는 결과와 일치하며, 이로부터 한반도와는 다른 아열대성 기후 지역인 제주의 식생(botanical source)이 양질의 propolis 생산에는 유리하지 못할 것으로 보인다. 그러나 남제주 표선(J4)에서 수집된 propolis의 경우 다른 지역에서 수집된 propolis(J1~J3, J5, J6)와는 다른 특이적 항생 활성을 나타내었던 바, 이에 대한 추가적인 생리활성과 식생 등에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 실험에서는 국내 제주도에서 수집된 propolis에 대한 전반적인 생리활성을 다양한 항산화 실험방법과 일반적 항균력 특성 판별법이 아닌 HPTLC/bioautography 방법을 이용하여 평가함으로써, propolis 구성성분에 따른 생리활성 능력을 신속하고 간단하게 측정할 수 있었으며 제주도에서 생산된 propolis의 수집된 지역별 특성도 확인할 수 있었다. 그 결과 제주도 산 propolis의 경우 한반도에서 수집된 propolis보다 다소 약하기는 하나 항산화 및 항균 활성이 우수한 것으로 확인되었으며, 이는 국내산 propolis를 이용하여 기능성 식품을 개발 및 제품화함에 있어 기초자료를 제공할 것으로 사료된다.

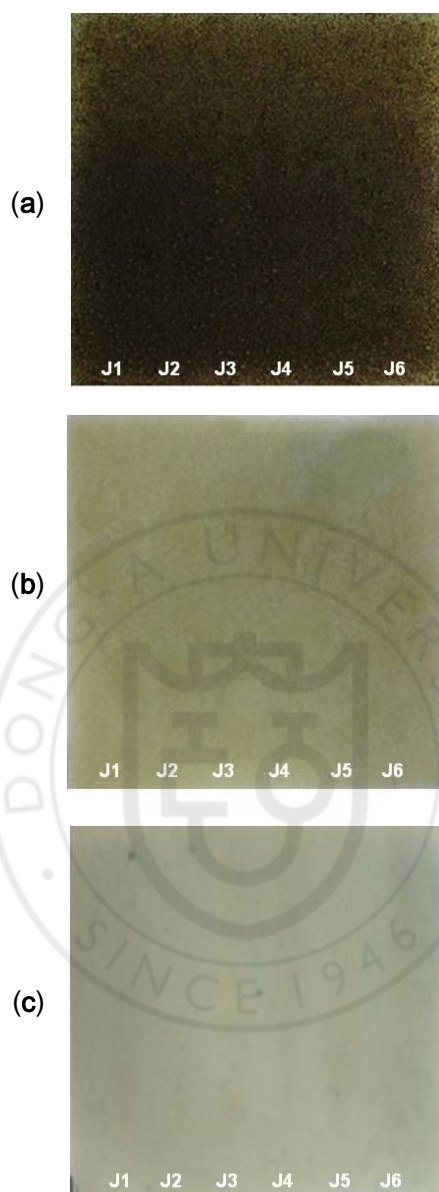


Fig. 16. Antifungal component of propolis against (a) *A. niger*, (b) *A. oryzae*, and (c) *P. chrysogenum* on HPTLC gel.

IV. 요 약

본 연구는 국내 제주도에서 수집되는 propolis의 수집지역에 따른 특성과 생리활성 기능에 대하여 평가하여 보고자 실시하였다. 제주 6 개 지역에서 수집된 propolis에 대하여 분석하여 본 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 페놀성 화합물(polyphenol compounds)을 분석한 결과, 제주도산 propolis의 총 polyphenol 함량은 평균 79.4 mg/g of EEP로 북제주 노형(J2)에서 수집된 propolis가 126.8 mg/g of EEP로 가장 높은 함량을 나타내었고, 북제주 한림(J5)에서 수집된 propolis의 경우 59.7 mg/g of EEP로 가장 낮았다. 총 flavonoid 함량은 평균 58.4 mg/g of EEP로 남제주 표선(J4)에서 수집된 propolis가 108.8 mg/g of EEP로 가장 높은 함량을 나타내었으며, 북제주 애월(J1)에서 수집된 propolis가 42.1 mg/g of EEP로 가장 낮은 총 flavonoid 함량을 나타내었다.
2. Propolis sample의 HPTLC pattern을 분석한 결과, 제주도에서 수집된 propolis에서 최대 15 개의 phenolic acid와 flavonoid band를 확인할 수 있었다. 북제주 애월(J1)과 북제주 노형(J2)에서 수집된 propolis를 제외한 다른 지역에서 수집된 propolis(J3~J6)는 각기 다른 양상의 band를 나타내었으며, 남제주 남원(J3), 남제주 표선(J5) 그리고 북제주 한림(J6)에서 수집된 propolis는 다소 약한 band를 확인할 수 있었으나 구성성분의 차이는 보이지 않았다. 그러나 남제주 표선(J4)에서 수집된 propolis는 다른 지역에서 수집된 propolis와는 상이한 pattern을 나타내었으며, 구성성분 또한 다소 차이가 있음을 확인할 수 있었다.
3. β -Carotene-linoleic acid system을 이용한 제주도에서 수집된 propolis의 antioxidant activity(%)는 8.6~25.4%로 북제주 노형(J2)에서 수집된 propolis가 가장 높은 활성을 나타내었고, 북제주 한림(J5)에서 수집된 propolis가 가장 낮은 antioxidant activity(%)를 나타내었다.

4. DPPH free radical 소거활성을 이용하여 측정한 제주도산 propolis의 항산화 능력은 북제주 노형(J2)에서 수집된 propolis가 26.7%로 합성 항산화제인 BHT와 비슷한 높은 항산화 활성을 나타내었으며, 남제주 표선(J4)에서 수집된 propolis가 6.2%로 가장 낮은 DPPH free radical-scavenging activity를 나타내었다.
5. 제주도에서 수집된 propolis의 ABTS radical cation-scavenging activity(%)는 평균 29.4%로 북제주 노형(J2)에서 수집된 propolis가 47.2%로 가장 높은 활성을 나타내었으며, 북제주 한림(J5)에서 수집된 propolis가 17.2%로 가장 낮은 antioxidant activity(%)를 나타내었다.
6. FRAP activity 분석법에 따른 항산화 활성 분석 결과 평균 71.1 $\mu\text{g/ml}$ 로, 제주도에서 수집된 6 개의 propolis 모두 positive control로 사용된 합성 항산화제인 BHT보다 높은 FRAP activity를 나타내었다.
7. 제주도에서 수집된 propolis의 대두유 산화억제능력 결과 북제주 노형(J2)에서 수집된 propolis에서 가장 강한 항산화 활성을 관찰 할 수 있었으며, 북제주 한림(J5)에서 수집된 propolis가 가장 약한 항산화활성을 확인할 수 있었으나 100 분경과 후부터는 대부분의 활성이 소실되었다
8. 제주도산 propolis의 Gram-positive bacteria 억제 능력을 확인한 바 *B. cereus*에서 최소 2 개에서 최대 6 개, *L. monocytogenes*에서 최소 2 개에서 최대 7 개, *S. aureus*에서 최소 1 개에서 최대 3 개 의 antibacterial band를 확인할 수 있었으나, gram-negative bacteria인 *E. coli*, *V. parahaemolyticus*, *S. typhimurium*에 대한 antibacterial band는 전혀 확인되지 않았다.
9. 제주도산 propolis에 대한 항곰팡이 활성을 관찰한 결과, *A. niger*, *A. oryzae*, *P. chrysogenum*에서 antifungal bands는 확인되지 않았다.

참 고 문 헌

1. Kumazawa, S., Hamasaka, T., and Nakayama, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem* 84: 329–339 (2004)
2. Burdock, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem. Toxicol* 36: 347–363 (1998)
3. 박호용, 오현우, 박두상, 장영덕. 한국산 봉교 추출물의 항생활성. *Korean J. Apiculture*. 10: 53–56 (1995)
4. Abd El Hady, F.K., and Hegazi, A.G. Egyptian propolis: 2. Chemical composition, antiviral and antimicrobial activities of East Nile Delta propolis. *Z. Naturforsch C* 57: 386–394 (2000)
5. Makashvili, Z.A. The characteristics of Georgian propolis. *propolis. Apimondia Publishing House*. 34 (1978)
6. Wollenweber, E., B.M. Hausen, and W.Greenway. Phenolic constituents and sensitizing properties of propolis, poplar balsam and balsam of Peru. *Bull. Groupe Polyphenols*. 15: 112–120 (1990)
7. Banskota, A.H., Tezuka, Y., and Kadota, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother. Res* 15: 561–571 (2001)
8. Ghisalberti, E.L. Propolis: a review. *BeeWorld*. 60: 59–84 (1979)
9. Silva, V., Genta, G., Möller, M.N., Masner, M., Thomson, L., Romero, N., Radi, R., Fernandes, D.C., Laurindo, F.R.M., Heinzen, H., Fierro, W., and Denicola, A. Antioxidant activity of Uruguayan propolis. *In Vitro and cellular assays. J. Agric. Food Chem* 59: 6430–6437 (2011)

10. Bankova, V. Recent trends and important developments in propolis research. *Evid. Based Complement Alternat Med* 2: 29–32 (2005)
11. Ahuja, V., and Ahuja, A. Apitherapy - A sweet approach to dental diseases. Part II: propolis. *J. Academy Adv. Dental Research*. 2 (2011)
12. Ahn, M.-R., Kumazawa, S., Hamasaka, T., Bang, K.-S., and Nakayama, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. *J. Agric. Food Chem* 52: 7286–7292 (2004)
13. Choi, Y.M., Noh, D.O., Cho, S.Y., Suh, H.J., Kim, K.M., and Kim, J. M. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *Food Sci. Technol* 39: 756–761 (2006)
14. 허용갑, 김나래, 윤원경, 조성기, 정우희, 박혜란. 국산 프로폴리스의 항균 및 내성균 억제 활성 검증. *Korean J. Apiculture*. 22: 71–78 (2007)
15. Kumazawa, S., Suzuki, S., Ahn, M.-R., Kamihira, M., Udagawa, Y., Bang, K. -S., and Nakayama, T. A new chalone from propolis collected on Jeju island, Korea. *Food. Sci. Technol. Res* 12: 67–69 (2006)
16. Kumazawa, S., Taniguchi, M., Suzuki, Y., Shimura, M., Kwon, M.-S., and Nakayama, T. Antioxidant activity of polyphenols in carob pods. *J. Agric. Food Chem* 50: 373–377 (2002)
17. Okada, Y. and Okada, M. Scavenging effect of water soluble proteins in broad beans on free radicals and active oxygen species. *J. Agric. Food Chem* 46: 401–406 (1998)
18. Woisky, R. G., and Salatino, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Agric. Res* 37: 99–105 (1998)
19. Emmons, C.L., Peterson, D.M., and Paul, G.L. Antioxidant capacity

- of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 2. In vitro antioxidant activity and content of phenolic and tocol antioxidants. *J. Agric. Food Chem* 47: 4894–4898 (1999)
20. Fellegrini, N., Ke, R., Yang, M., and Rice-Evans, C. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid radical cation decolorization assay. *Methods Enzymol* 299: 379–389 (1999)
21. Benzie, I.F.F. and Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP assay. *Anal. Biochem* 239: 70–76 (1996)
22. Hamasaka, T., Kumazawa, S., Fuimoto, T., and Nakayama, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Japan. *Food. Sci. Techol. Res* 18: 86–92 (2004)
23. Bonvehí, J.S., and Gutiérrez, A.L. Antioxidant activity and total phenolics of propolis from the Basque country (Northeastern Spain). *J Am. Oil. Chem. Soc* 88: 1387–1395 (2011)
24. Isla, M.I., Nieva Moreno, M.I., Sampietro, A.R., and Vattuone, M.A. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. *J. Ethnopharmacol* 76: 165–170 (2001)
25. Kalogeropoulos, N., Konteles, S.J., Troullidou, E., Mourtzinou, I., and Karathanos, V.T. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chem* 116: 452–461 (2009)
26. Gregoris, E., and Stevanato, R. Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian propolis. *Food Chem*

Toxicol 48: 76–82 (2010)

27. Popova, M., Bankova, V., Butovska, D., Petkov, V., Nikolova-Damyanova B., Sabatini A.G., Marcazzan, G.L. and Bogdanov, S. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochem. Anal* 15: 235–240 (2004)
28. Lima, B., Tapia, A., Luna, L., Fabiani, M.P., Schmeda-Hirschmann, G., Podio, N.S., Wunderlin, D.A., and Feresin, G.E. Main Flavonoids, DPPH Activity, and Metal Content Allow Determination of the Geographical Origin of Propolis from the Province of San Juan (Argentina). *J. Agric. Food Chem* 57: 2691–2698 (2009)
29. Watson, D.G., Peyfoon, E., Zheng, L., Lu, D., Seldel, V., Johnston, B., Parkinson, J.A., and Fearnley, J. Application of principal components analysis to H-NMR data obtained from propolis samples of different geographical origin. *Phytochem. Anal* 17: 323–331 (2006)
30. Sulaiman, G.M., Al Sammarrae, K.W., Adhiah, A.H., Zucchetti, M., Frapolli, R., Bello, E., Erba, E., D'Incalci, M., and Bagnati, R. Chemical characterization of Iraqi propolis samples and assessing their antioxidant potentials. *Food Chem. Toxicol* 49: 2415–2421 (2011)
31. Banskota, A.H., Tezuka, Y., Adnyana, I.K., Midorikawa, K., Matsushige, K., Message, D., Huertas, A.A., and Kadota, S. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, Netherlands and China. *J. Ethnopharmacol* 72: 239–246 (2000)
32. da silva, J.F.M., de Souza, M.C., Matta, S.R., de Andrade, M.R., and Vidal, F.V.N. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian

- propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chem* 99: 431–435 (2006)
33. Russo, A., Cardile, V., Sanchez, F., Troncoso, N., Vamella, A., and Garbarino, J.A. Chilean propolis antioxidant activity and antiproliferative in human tumor cell lines. *Life Science*. 76: 545–558 (2004)
34. Yang, H., Dong, Y., Du, H., Shi, H., Peng, Y., and Li, X. Antioxidant compounds from propolis collected in Anhui, China. *Molecules*. 16: 3444–3455 (2011)
35. Prior, L. R., Wu, X., and Schaich, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem* 53: 4290–4302 (2005)
36. Mohammadeadeh, S., Sharriatpanahi, M., Hamed, M., Amazadeh, Y., Sadat Ebrahimi, S.E., and Ostad, S.N. Antioxidant power of Iranian propolis extract. *Food Chem* 103: 729–733 (2007)
37. 정창호, 신창식, 배영일, 심기환. 프로폴리스 에탄올 및 물 추출물의 항산화 활성. *J. Korean. Soc. Food Sci Nutr* 39: 1725–1730 (2010)
38. Ahn, M.-R., Kunimasa, K., Kumazawa, S., Nakayama, T., Keji, K., Uto, Y., Hori, H., Nagasawa, H., and Ohta, T. Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis. *Mol. Nutr. Food Res* 53: 643–651 (2009)
39. Lee, S.H., Lee, J.B., Lee, K.W., and Jeon, Y.J. Antioxidant properties of tidal microalgae, *Halochlorococcum porphyrae* and *Oltamanniellopsis unicellularis* from Jeju island, Korea. *Algae*. 25: 45–56 (2010)
40. 한승관. 식용유지 산화에 대한 propolis병 항산화 효과, *Korean. J. Food Sci. Ani. Resour* 23:168–171 (2003)

41. 박은령, 이선규, 황혜신, 문춘선, 껍인신, 김옥희, 이광호. 가공식품 중 천연유래 보존료 함량에 대한 조사. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr* 37: 1640–1646 (2008)
42. 차재윤, 조용진, 김철진, 김중태. 식품저장을 위한 propolis 함유 젤라틴 포장필름의 특성. *Food Engineering Progress*. 11: 112–118 (2007)
43. Gülhan Vardar-Ünlü, Sibel Silici, and Mehmet Ünlü. Composition and in vitro antimicrobial activity of Populus buds and poplar-type propolis. *World J. Microbiol Biotechnol* 24: 1011–1017 (2008)
44. Seidel, V., Peyfoon, E., Watson, D.G., and Fearnley, J. Comparative study of the antibacterial activity of propolis from different geographical and climatic zones. *Phytother. Res* 22: 1256–1263 (2008)
45. Nakamura. S, Kato Am, Kobayashi, K. New antimicrobial characteristics of lysozyme-dextran conjugate. *J. Agric Food Chem* 39: 647–650 (1991)
46. 박선일, 이윤조, 차용호, 안목련. High performance thin-layer chromatography 분석법에 의한 국내산 propolis 향균 및 항곰팡이 활성. *Korean. J. Apiculture*. 28: 93–102 (2011)

ABSTRACT

Studies on Characteristics and Biological Activities of Propolis Collected on Jeju island, Korea

by
Choi, Su Jin

*Dept. of Food Science
Graduate School, Dong-A University
Busan, Korea*

This study examined the antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the ethanol extracts of propolis (EEP) from Jeju island, Korea.

The amount of total polyphenol and flavonoid contents in Jeju propolis varied widely, ranging from 59.7 to 126.8 mg/g of EEP and from 42.1 to 108.8 mg/g of EEP, respectively.

EEP samples were observed fifteen flavonoid and phenolic acid bands on High performance thin-layer chromatography (HPTLC) plate. Propolis samples, except EEP from Bukjeju Aewol (J1) and Bukjeju Nohyeung (J2), were displayed dissimilar band pattern on HPTLC plate.

EEP were prepared and evaluated for their antioxidant activities by β -carotene bleaching, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical cation, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging, and ferric reducing ability of plasma (FRAP) assays.

EEP from Bukjeju Nohyeung (J2) had a stronger antioxidant activities than those from other regions in the four antioxidant assays and had

similar to BHT in DPPH free radical-scavenging activity and ABTS radical cation-scavenging activity. However, that from Bukjeju Hallim (J5) had weak antioxidant activities. All EEP samples had stronger FRAP activity than BHT. Propolis from Bukjeju Nohyeung(J2) had relatively strong antioxidant activity accompanied by high total polyphenol, but propolis from Bukjeju Hallim(J5) had weak that.

The results of gram-positive bacterial inhibiting activity on HPTLC plate, EEP samples displayed six strong antibacterial bands against *B. cereus*, seven strong antibacterial bands against *L. monocytogenes* and three strong antibacterial bands against *S. aureus*. However, all EEP samples not reveal antibacterial activity in gram-negative bacteria and molds.

EEP samples were more effective against gram-positive bacteria than gram-negative ones and molds. Furthermore, all EEP samples except that from Bukjeju Hallim(J5) had relatively strong antibacterial activities distant from other sample areas. It reveals that components of propolis are different with geographic origin and there are more important than total contents of polyphenol and flavonoid.