

GOVP1200624799

Tool6099

최 종
연구보고서

국산 프로폴리스를 이용한 무알콜
수용성의 기능성식품 개발과 임상실험을
통한 항산화 및 면역증강효과의 검증

Development of a non-alcoholic water-soluble
propolis functional food with Korean propolis
and evaluation of its clinical efficacy for
antioxidant and immune functions.

주관연구기관 : 서울프로폴리스(주)

협동연구기관 : 한국원자력연구소

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “국산 프로폴리스를 이용한 무알콜 수용성의 기능성 식품 개발과 임상실험을 통한 항산화 및 면역증강효과의 검증” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006 년 5 월 24 일

주관연구기관명 : 서울프로폴리스(주)

총괄연구책임자 : 허 용 갑

세부연구책임자 : 허 용 갑

연 구 원 : 백 병 학, 김 나 래

협동연구기관명 : 한국원자력연구소

협동연구책임자 : 조 성 기

연 구 원 : 정 우 희, 박 혜 란,
김 영 숙, 이 인 아

위탁연구기관명 : 한국양봉농협협동조합

위탁연구책임자 : 정 동 현

연 구 원 : 김 창 영

위탁연구기관명 : 울산대학교 의과대학

위탁연구책임자 : 진 영 수

연 구 원 : 이 한 준, 박 은 경,
이 혜 영

요 약 문

I. 제 목

국산 프로폴리스를 이용한 무알콜 수용성의 기능성식품 개발과 임상실험을 통한 항산화 및 면역증강효과의 검증

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 프로폴리스는 꿀벌들이 여러 식물들의 표피, 잎 등에서 채취한 수지(樹脂)에 벌 자신의 타액을 혼합하여 만든 복합물질로서 항산화, 항균, 항염, 면역증강 등의 생리활성 기능을 지닌 차세대 천연 기능성소재임
- 프로폴리스는 기능성 식품, 화장품, 의약품, 생활용품 등의 원료로서 일본시장은 4,000억 규모이나 현재 국내시장은 150억에 불과함
- 국내에서는 프로폴리스의 추출, 정제, 가공하는 기술력과 무알콜·수용화 기술부족 때문으로 일본, 호주, 중국, 브라질 등으로부터 가공원료 및 완제품을 수입에 의존하고 있음.
- 국내에서 에탄올 추출에 의한 에탄올 함유제품 또는 원료 개발 연구가 수행되었으나 그동안 에탄올 함유제품에 대한 규제와 난용성 등 섭취 및 소재로서의 적용성이 현저히 떨어져 실용화에 성공하지 못함.
- 국내 프로폴리스 시장은 2004년 8월 규제가 완화(주세법에서 제외) 이후에도 수입 완제품이 주류를 이루고 있고 이는 프로폴리스의 다양한 기능을 과학적으로 규명하고 안전하게 제품 개발해 나가는 연구 활동이 아직까지는 미비한 실정이다.
- 따라서, 이를 극복하기 위해서 본 과제에서는 고효능 국산 프로폴리스 원료의 선발, 추출 및 정제법 확립, 동물 및 임상 효능 검증을 통하여 국내 원료와 기술을 이용한 프로폴리스 제품을 개발하고자 하였음.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 국내프로폴리스의 산지별, 계절별 유효성분 분석 및 효능검증(vitro, vivo)을 통한 우수한 원료 선별 및 국산 프로폴리스를 이용한 무알콜·수용성 시작품 공정개발

- 1) 국내 프로폴리스 현황조사
- 2) 산지별 프로폴리스 채취
- 3) 유효성분 함량 분석
- 4) 항균성 평가
- 5) *In vitro* 항산화 효능 평가(국산, 외산 비교 실험)
- 6) *In vivo* 항산화 효능평가(선정된 국산, 외산 비교실험)
- 7) 프로폴리스의 유효성분 추출률 증대
- 8) 무알콜·수용화 공정법 개발

2. 국산 프로폴리스를 이용한 무알콜·수용성 시작품 제작 과 *In vitro, in vivo* 및 임상실험 검증및 시장성 평가, 생산시스템 도출

- 1) 무알콜·수용화 공정 개발에 의한 시작품 제작
- 2) 시작품 *in vivo* 항산화 효능 비교평가(동물실험)
- 3) 프로폴리스를 섭취한 임상실험의 혈액시료에서 항산화 및 면역활성 보호 효과 평가
- 4) 시작품의 시장성 평가
- 5) 국산 프로폴리스 생산시스템 도출

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 국내 프로폴리스의 생산지 별 유효성분 분석 및 효능 검정을 통한 우수원료 선별

■ 위탁연구기관인 한국양봉농업협동조합의 협조로 국내 프로폴리스를 생

산지별로 18종 채집하여 총 플라보노이드, 유효성분 정량분석, 항균성 등을 조사 수행

- 생산지별 유효성분 함량분석 결과, 생산지에 따라 색상과 총 플라보노이드 함량, 유효성분 함량 등이 각각 다르게 나타났으나 공통적으로 Caffeic acid, Cinnamic acid, Chrysin, Flavone 등의 유효성분과 탄수화물, 단백질, 지방 등의 영양성분, 미네랄 성분을 다량 함유하였음
- 생산지별 항균활성 분석 결과, 전반적으로 *Bacillus subtilis* (KCTC 1022)에 대한 항균활성이 가장 높았으며, *Salmonella typhimurium* (KCTC 2515), *Candida albicans* (KCTC 7965), *Staphylococcus aureus* (CCARM 201), *Pseudomonas aeruginosa* (CCARM 225)에도 높은 활성을 나타냄
- 그러나 기준치 이상의 납이 검출되고 미량의 잔류 농약과 항생물질이 검출되는 시료가 있어 안정성에 대한 주의가 필요함.

2. 국내산 프로폴리스의 생산지별 항산화 효능 평가

- 국내산 프로폴리스의 생산지에 따른 항산화활성을 평가하고자 *in vitro* 항산화실험을 수행하였으며, 국내산 중 우수시료를 선발하여 국외산과 항산화 활성을 비교 검증하여 시작품 개발을 위한 국내산 프로폴리스를 최종 선발하였음.
- 국내 18개 지역에서 채집된 프로폴리스의 *in vitro* 항산화활성 실험을 수행한 결과, DPPH radical 소거활성, superoxide anion radical 소거활성, lipid peroxidation 억제효과 실험에서 P12와 P13 지역의 프로폴리스가 높은 활성을 나타내어 우수 국내산 프로폴리스 시료로서 P12와 P13 프로폴리스를 선발하였음.
- 브라질산 프로폴리스(BP)와 중국산 프로폴리스(CP)를 대조군으로 하여 국내에서 선별된 프로폴리스와 비교 실험을 수행하였음.
 - *in vitro* 항산화 실험에서 국내산인 P12와 P13이 BP에 비해 월등히 높은 항산화활성을 나타내었음.
 - 사염화탄소(CCl_4)에 의한 산화적 손상을 유발한 마우스 모델에서도 국내산 P12와 P13이 외국산 BP, CP에 비해 활성이 뛰어났음.

- 국내산 P12와 P13의 활성은 큰 차이를 나타내지 않았으나, 대체적으로 P12의 활성이 약간 높았음.
- 이러한 결과를 바탕으로 국내 18개 지역에서 채집한 프로폴리스 중 가장 항산화 활성이 뛰어난 P12(강원도 삼척산)를 시작품 제조용 원료로 최종 선발하였음.

3. 프로폴리스의 유효성분 추출을 증대 및 무알콜·수용화 공법개발

- 국산 프로폴리스의 추출물 제조 최적 조건 연구결과, 추출용매는 75% 에탄올, 추출 온도는 40℃, 추출 시간은 8시간으로 나타남.
- 추출된 프로폴리스의 무알콜 수용화 제조방법으로서 75%에탄올에 침지한 후 추출, 여과하여 알칼리 및 유기산 그리고 정제수를 첨가하면서 에탄올 회수하여 무알콜 수용성의 프로폴리스를 제조하는 방법을 확립하였음.
- 본 무알콜·수용성 프로폴리스 제조방법은 추출율 및 유효성분인 플라보노이드의 함량이 개선되었을 뿐 아니라, 물에서 완전히 용해되어 프로폴리스 추출물 고유의 점착성에 따른 사용상의 불편함이 해소되어 건강기능식품 및 가공식품의 원료로서 높은 활용성이 기대됨.
- 국내산중 가장 활성이 우수한 P12(강원 삼척) 지역 프로폴리스를 대량 구매하여 본 공법에 따라 무알콜·수용성 프로폴리스 시작품을 생산하였고, 동물실험 및 임상실험을 위한 시작품을 제작하였음.

4. 프로폴리스 시작품의 동물모델에서 항산화 및 면역활성 보호효과

- 본 연구에서는 항산화 가장 우수한 국내산 프로폴리스(P12)를 이용하여 제조한 무알콜 수용성 프로폴리스 시작품(WEEP)의 생체내 항산화 및 면역시스템 보호효과를 검증하였음.
 - 시작품을 경구섭취한 마우스에서는 사염화탄소로 유발된 간조직 및 혈장내의 지질과산화물(MDA)의 양이 유의적으로 감소하였음.
 - 시작품은 방사선에 의한 산화적 손상으로부터 면역 및 조혈계(골수

세포 및 조혈모세포)를 보호하는 효과가 관찰되었음.

- 이러한 결과는 무알콜 수용성 프로폴리스 시작품이 생체내의 산화적 손상을 억제하고 면역조혈계를 보호하는 효과가 뛰어난을 보여주어 항산화 식품으로서 임상적으로 적용 가능성을 시사하였음.

5. 프로폴리스시작품의 항산화 및 면역활성 보호 임상 시험

- 본 연구에서는 무알콜 수용성 프로폴리스 시작품의 임상 효능 검증을 위하여 운동부하에 의한 산화적 스트레스 및 염증 면역반응 유발 모델에서 시작품의 효능을 검증하였음.
- 2주간 프로폴리스를 섭취시키고 운동유발성 과산화지질 생성 정도 및 항산화 능력을 분석한 결과, 프로폴리스를 섭취한 그룹과 위약군간에 통계적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았음.
- 그러나 프로폴리스 섭취군에서 MDA가 처치 전에 비해 낮아지는 경향을 보이고 반면 TAS는 높아지는 경향을 보여 국산 프로폴리스의 항산화 효과가 있는 것으로 사료됨.
- 면역반응과 관련된 염증반응 인자인 IL-6와 TNF- α 의 분석결과, 두 집단간에 통계적으로도 유의한 차이나 경향성을 발견하지 못하였으며, 프로폴리스 섭취군의 처치 전후 이들 변인의 변화경향이 없는 것으로 보아 염증반응을 일으킬 만큼 충분한 운동자극에 도달하지 못한 것으로 판단됨.
- 그럼에도 불구하고 항산화 능력이 향상되는 경향으로 보아 국산 프로폴리스가 중정도 강도의 운동 후에도 산화적 스트레스를 감소시키고 항산화 능력을 개선시키는 긍정적인 효과가 있는 것으로 사료됨.

6. 무알콜·수용성 프로폴리스의 시장성 평가

- 무알콜·수용성 프로폴리스는 일차적으로 건강기능식품에 적용될 수 있고, 나아가 화장품, 의약품, 생활용품까지 확대 및 응용될 수 있을 것으로 평가됨.
- 국내 프로폴리스 건강기능성식품 시장은 2005년 기준으로 약 454억원

정도에 이르는 것으로 추정되고 있으며, 향후 5년 후에는 연평균 12.5%로 성장하여 2010년 910억원의 시장으로 확대될 전망이다.

- 시장 확대의 전망에도 불구하고 공급측면에서는 기존의 프로폴리스 업체뿐만 아니라 외국 기업들이 이미 국내시장에 프로폴리스 건강기능식품들을 판매하고 있어 신청기업의 입장에서 볼 때 시장상황이 반드시 유리하다고는 볼 수 없음.
- 그러나 최근 조류 독감 바이러스가 유행하면서 항균성 건강보조식품의 시장이 더 커질 것이라는 예측도 있어, 지금까지 주로 판매되고 있는 알코올 프로폴리스가 수용성 프로폴리스에 의해 대체된다면 원료공급자로서 안정된 판로의 확보가 가능할 것으로 판단됨.
- 따라서 이러한 점들을 전체적으로 고려하여 판단할 때 무알콜·수용성 프로폴리스의 시장성은 비교적 긍정적으로 평가됨.

SUMMARY

I . Title of the Project

Development of a non-alcoholic water-soluble propolis functional food with Korean propolis and evaluation of its clinical efficacy for antioxidant and immune functions.

II. Objective and Importance of the Project

- Propolis is a complex mixture of gums, resins, and balms from plants, and bee's wax and salivary secretions of resins, and is recognized as a new generation natural material with various physiological activities such as antioxidant, anti-bacterial, anti-inflammatory, immune-enhancing activities.
- The market size of propolis products as functional food, cosmetics, medicine, and home supplies in Japan is estimated to be 400 billion won. By contrast, the Korean market size is only 15 billion won.
- In Korea, the raw material and whole product are mainly imported from Janpan, Australia, China, and Brazil, due to the low level of domestic technologies in extraction, purification, processing, and non-alcoholilic water-solubilization,
- In Korea, there has been research on developing the ethanol-containing raw material or products, but its commercialization failed due to the strict regulation of ethanol-containing products and the low applicability of water-insoluble products.
- The Korean market is composed mainly of imported whole products although the regulation was relaxed, and still the research activities on propolis products are still insufficient.
- Therefore, to overcome this current problems in propolis market in

Korea, we purposed to develop Korean propolis product by selecting highly active Korean propolis raw material, establishing the extraction and purification process, and evaluating the animal and clinical efficacy,

III. Contents and Scope of the Project

1. Selection of excellent Korean propolis raw material by active compound analysis and evaluation of activities, development of production process for non-alcoholic water-soluble product
 - 1) Survey on status of the propolis production in Korea
 - 2) Collection of propolis samples from various regions in Korea
 - 3) Analysis of active compound contents
 - 4) Evaluation of anti-bacterial activities
 - 5) Evaluation of *in vitro* antioxidant activities
 - 6) Evaluation of *in vivo* antioxidant activities
 - 7) Enhancement of extraction yields of active compounds of propolis
 - 8) Development of production process for non-alcoholic water-soluble propolis product
2. Production of non-alcoholic water-soluble pilot product with Korean propolis, evaluation of *in vivo* and clinical efficacy, evaluation of marketability, establishment of production system
 - 1) Production of the pilot product by non-alcoholic water-soluble process
 - 2) Evaluation of *in vivo* antioxidant activities of the pilot product
 - 3) Evaluation of clinical efficacy of the pilot product for the antioxidant and immune-protecting effects.
 - 4) Evaluation of the marketability of the pilot product

5) Establishment of production system of Korean propolis product

IV. Results of the Project and Application

1. Selection of excellent Korean propolis raw material by analysis of active compounds and evaluation of activity

- Total 18 propolis samples were collected from different regions in Korea and were analyzed for the contents of total flavonoids, active compounds, and anti-bacterial activity.
- In the analysis of the active compound contents, the total flavonoid and active compound contents varied according to the production regions, but all samples showed high contents of caffeic acid, cinnamic acid, chrysin, flavone, carbohydrate, protein, fat, and minerals.
- In the analysis of the anti-bacterial activities, all propolis samples showed highest anti-bacterial activity against *Bacillus subtilis* (KCTC 1022), and also showed relatively high activity against *Salmonella typhimurium* (KCTC 2515), *Candida albicans* (KCTC 7965), *Staphylococcus aureus* (CCARM 201), and *Pseudomonas aeruginosa* (CCARM 225).
- However, since lead content was higher than the regulation standard and trace pesticide and antibiotics were detected in some samples, precaution is required to ensure the safety of the Korean propolis samples.

2. Evaluation of antioxidant activities of Korean propolis

- To evaluate the antioxidant activities of Korean propolis samples from different regions, in vitro antioxidant assays were performed. Two Korean propolis samples were selected and its activities were

compared with two foreign propolis samples, and finally one Korean sample was selected for the production of pilot product.

- In the in vitro antioxidant assays for the 18 Korean propolis samples, P12 and P13 showed highest activities in DPPH radical scavenging, superoxide anion radical scavenging, and lipid peroxidation inhibition assays. P12 and P13 were selected as excellent Korean propolis samples.
- Two selected Korean propolis samples were compared with Brazilian propolis (BP) and Chinese propolis (CP).
 - In vitro antioxidant assays revealed the P12 and P13 had the superior activity compared to BP.
 - In mouse experiments in which oxidative stress was induced by tetrachlorocarbon (CCl₄), P12 and P13 showed higher activity than BP and CP.
 - Although P12 and P13 did not show marked differences in activities, P12 showed higher activity in general than P13.
 - Based on these results, P12 (from Samcheok, Kangwon, Korea) was finally selected for the raw propolis material for the pilot product.

3. Development of production process for active component extraction yield, and non-alcoholic water-soluble propolis product

- The optimal extraction conditions of Korean propolis were, 75% ethanol for the extraction solvent, 40°C for extraction temperature, and 8 hour for extraction time.
- The production process for non-alcoholic water-soluble propolis product was established as follows: extraction in 75% ethanol, filtration, addition of alkali/organic acid/purified water, and recovery of ethanol.

- This new production process for non-alcoholic water-soluble propolis improved the extraction yield and flavonoid content and also water-solubility resolved the problem of user inconvenience derived from sticky properties of propolis, which will increase the applicability as the raw material of health functional foods and processed foods.
- Then the non-alcoholic water-soluble propolis pilot product was manufactured from the P12 which showed highest activities among Korean propolis samples.

4. Evaluation of antioxidant and immune-protecting activities of the propolis pilot product in animal model.

- In this study, the non-alcoholic water-soluble pilot product prepared from Korean propolis with highest activity (P12) was evaluated for its in vivo antioxidant and immune-protecting activities.
 - The administration of the pilot product significantly reduced lipid peroxidation product (MDA) in the liver and plasma of the mice treated with CCl₄.
 - The administration of the pilot product protected the immune and hematopoietic system (bone marrow cell and hematopoietic stem cell) against the oxidative damage induced by irradiation.
- These results showed that the pilot product has the marked effects in reducing the oxidative damage and protecting the immune/hematopoiesis system, and, therefore, that the pilot product can be clinically applied as a antioxidant food.

5. Clinical study on the antioxidant and immune-protecting effects of the propolis pilot product

- In this study, we evaluated the clinical efficacy of the pilot product

to reduce oxidative stress and inflammatory immune response in an exercise-induced oxidative stress model.

- Supplementation of propolis pilot product for 2 weeks did not show statistically significant changes in lipid peroxidation product (MDA) and total antioxidant status between propolis group and placebo group.
- However, propolis group showed a trend of MDA decrease and TAS increase after supplementation, which suggested that the pilot product might have antioxidant activities in human bodies.
- In the analysis of IL-6 and TNF- α , cytokines associated with inflammatory immune responses, no significant differences and trends were observed between two groups. Also no change in these cytokines was observed between pre- and post-treatment in the propolis group, which suggested that the exercise was not sufficient to induce the inflammatory responses.
- Although these results were not statistically significant, they suggest that the propolis pilot product may have positive effects such as reducing oxidative stress and enhance the antioxidant capacity of the body even after the medium level of exercise.

6. Evaluation of marketability of non-alcoholic and water-soluble propolis

- The non-alcoholic water-soluble propolis was evaluated to be applied primarily to health functional foods and also to cosmetics, medicine, and home supplies.
- The Korean market for propolis functional foods was estimated to be 45.4 billion won in 2005, and is expected to grow at 12.5% per year and reach 91 billion won in 2010.
- Despite the rapid expansion of the market, the market situation is not advantageous to our company since many Korean and foreign

- companies are already selling the propolis functional foods in Korea.
- However, it is postulated that the anti-bacterial health functional food market will grow much faster than expected due to the circulation of avian influenza viruses, which will be advantageous to our company as a raw material provider if the alcoholic propolis is replaced by water-soluble propolis products.
 - Therefore, considering all these aspects, the marketability of non-alcoholic water-soluble propolis seems to be positive.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction

Section 1. Importance of the Project

1. Overview of the target technology
2. Importance of the target technology

Section 2. Objective and Contents of the Project

1. Final goal of the project
2. Objective and contents by year

Section 3. Expected Benefits of the Project

1. Technical aspects
2. Economical and industrial aspects
3. Benefits to farmers

Chaper 2. State of the Art Report

Section 1. Overview of the technology

1. Definition and structure of propolis
2. Major activities of propolis
3. Extraction method of propolis

Section 2. State of the Art

1. State of the art in Korea
2. Alternative and competing technologies
3. Future technologies

Chapter 3. Contents and Results of the Project

Section 1. Selection of excellent Korean propolis raw material by analysis of active compounds and evaluation of activity

1. Overview
2. Methods
3. Results

4. Conclusion

Section 2. Evaluation of antioxidant activities of Korean propolis

1. Overview

2. Methods

3. Results

4. Conclusion

Section 3. Development of production process for active component extraction yield, and non-alcoholic water-soluble propolis product

1. Overview

2. Methods

3. Results

4. Conclusion

Section 4. Evaluation of antioxidant and immune-protecting activities of the propolis pilot product in animal model

1. Overview

2. Methods

3. Results

4. Conclusion

Section 5. Clinical study on the antioxidant and immune-protecting effects of the propolis pilot product

1. Overview

2. Methods

3. Results

4. Conclusion

Section 6. Evaluation of marketability of non-alcoholic and water-soluble propolis

1. Overview

2. Methods

3. Results

4. Conclusion

Chapter 4. Achievment of Research Goals and External
Contribution of Main Results

Chapter 5. Plan of Utilization of the Results

Chapter 6. References

목 차

제 1 장 서 론

제 1절 연구개발의 중요성

1. 개발대상기술의 개요
2. 개발대상기술의 중요성

제 2절 연구개발의 목표 및 내용

1. 기술개발의 최종 목표
2. 연차별 연구개발의 목표와 내용

제 3절 연구개발의 기대효과

1. 기술적 측면
2. 경제 산업적 측면
3. 농가파급효과

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1절 기술개요

1. 프로폴리스의 정의와 구조
2. 프로폴리스의 주요작용
3. 프로폴리스의 추출법

제 2절 국내의 기술개발현황

1. 국내의 기술개발현황
 - 가. 프로폴리스 추출방법에 대한 동향
 - 나. 추출된 프로폴리스에 대한 연구 동향
2. 대체 기술 및 경쟁기술 동향
3. 향후 기술

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1절 국내 프로폴리스의 생산지 별 유효성분 분석 및 효능 검정을 통한 우수원료 선별

1. 개요
2. 연구 방법

가. 국내 프로폴리스 현황 조사

- 1) 국내 프로폴리스 관련 자료 조사
- 2) 생산지별 프로폴리스 채취

나. 국내 프로폴리스 유효성분 함량 분석

- 1) 총 플라보노이드 함량 분석
- 2) HPLC를 이용한 유효성분 함량 분석
- 3) 국산 프로폴리스의 정량적 분석

다. 국내 프로폴리스 항균성 평가

- 1) 유해균종에 대한 항균 활성 억제 효과
- 2) 항생제 내성 균종에 대한 항균 활성 억제 효과

3. 연구 결과

가. 국내 프로폴리스 현황 조사

- 1) 국내 프로폴리스 관련 자료 조사
- 2) 생산지별 프로폴리스 채취

나. 국내 프로폴리스 유효성분 함량 분석

- 1) 총 플라보노이드 함량 분석
- 2) HPLC를 이용한 유효성분 함량 분석
- 3) 국산 프로폴리스의 정량적 분석

다. 국내 프로폴리스 항균성 평가

- 1) 유해균종에 대한 항균 활성 억제 효과
- 2) 항생제 내성 균종에 대한 항균 활성 억제 효과

4. 결론

제 2절 국내산 프로폴리스의 생산지별 항산화 효능 평가

1. 개요

2. 연구 방법

가. 국내산 프로폴리스의 *In vitro* 항산화 효능 평가

- 1) DPPH radical 소거 활성 측정
- 2) Superoxide anion radical 소거 활성 측정
- 3) 지질과산화 억제 활성 측정
- 4) DNA 방어 효과 검색

나. *In vivo* 항산화 효능 평가

- 1) 실험동물 및 시료 투여
- 2) 혈장내의 malondialdehyde(MDA) 측정
- 3) 간조직내의 malondialdehyde(MDA) 측정
- 4) 혈장내의 glutathione(GHS)의 농도 측정

3. 연구 결과

가. 국내산 프로폴리스의 *in vitro* 항산화 활성 비교

나. 선별된 국내 프로폴리스와 국외 프로폴리스의 항산화 활성 비교

1) 국내산 프로폴리스의 *In vitro* 항산화 효능 평가

- 가) DPPH radical 소거 활성 측정
- 나) Superoxide anion radical 소거 활성 측정
- 다) 지질과산화 억제 활성 측정
- 라) DNA 방어 효과 검색

2) *In vivo* 항산화 효능 평가

- 가) 간조직내의 malondialdehyde(MDA) 측정
- 나) 혈장내의 malondialdehyde(MDA) 측정
- 다) 혈장내의 glutathione(GHS)의 농도 측정

4. 결론

제 3절 프로폴리스의 유효성분 추출을 증대 및 무알콜·수용화 공법개발

1. 개요

2. 연구 방법

가. 프로폴리스의 유효성분 최적 추출 조건 확립

나. 무알콜·수용화 공법 개발

다. 무알콜·수용화 공법에 의한 시작품 개발 방법

- 1) 무알콜·수용화 공법을 통한 시작품 생산 방법
- 2) 시작품 평가(식품공전) 방법
- 3) 임상실험용 시작품 생산 방법

3. 연구 결과

가. 프로폴리스의 유효성분 최적 추출 조건 확립

나. 무알콜·수용화 공법 개발

다. 무알콜·수용화 공법에 의한 시작품 개발

- 1) 무알콜·수용화 공법을 통한 시작품 생산

2) 시작품 평가(식품공전)

3) 임상실험용 시작품 생산

4. 결론

제 4절 프로폴리스 시작품의 동물모델에서 항산화 및 면역활성 보호효과

1. 개요

2. 연구 방법

가. 사염화탄소 투여 마우스에서 지질과산화 억제 효과 측정

나. 방사선 조사 마우스에서 소핵 형성 측정

다. 방사선 조사 마우스에서 비집락 형성 측정

3. 연구 결과

가. 사염화탄소 투여 마우스에서 지질과산화 억제 효과 측정

1) 간조직 내의 지질과산화율 억제 효과

2) 혈장 내의 지질과산화율 억제 효과

나. 방사선 조사 마우스에서 면역조혈계 보호 효과

1) 골수세포의 염색체 손상 경감효과

2) 조혈모세포의 생존(비장 내 집락 형성)증가 효과

4. 결론

제 5절 프로폴리스시작품의 항산화 및 면역활성 보호 임상 시험

1. 개요

2. 연구 방법

가. 임상시험설계

나. 피시험자 선정

다. 시험설계

1) AT 110% 시점 산출을 위한 운동 부하 검사 실시

2) AT 110% 시점의 산출

3) 사전검사

4) 프로폴리스 복용

5) 사후 검사

라. 프로폴리스 시작품 투여 방법

마. 혈액 내 지표의 측정 방법

1) 혈장의 총 항산화능(TAS) 측정

2) 혈장 내 Lipide peroxidation 지표(MDA) 측정

3) 혈액 내 Cytokine 측정

바. 통계적 처리

3. 연구 결과

가. 피험자의 신체적 특성

나. 혈장 내의 지질과산화물(MDA) 분석 결과

다. 혈장내 총 항산화능(TAS) 분석 결과

라. 혈청내 TNF- α 농도 분석 결과

마. IL-6의 분석결과

4. 결론

제 6절 무알콜·수용성 프로폴리스의 시장성 평가

1. 개요

2. 연구 방법

3. 연구 결과

가. 시장 개요 및 특성

1) 시장 개요

2) 시장 특성

3) 기회 및 위험 요인

나. 국내외 시장 현황 및 전망

1) 세계시장 현황

2) 국내 시장 현황

4. 결론

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 6 장 참고문헌

제 1 장 서 론

제 1절 연구개발의 중요성

1. 연구개발의 목적

가. 개발대상기술의 개요

프로폴리스는 꿀벌들이 자신들의 생존환경을 유지하기 위하여 여러 식물들의 표피, 잎 등에서 채취한 수지(樹脂)에 벌 자신의 타액(Enzyme)을 혼합물들 하여 만든 복합 물질이며, 항산화, 항균, 항염, 면역증강 등의 생리활성 기능을 가지는 차세대 천연 기능성 소재이다. 차세대 기능성 물질인 프로폴리스는 기능성 식품, 화장품, 의약품, 생활용품 등 광범위한 용도로 일본시장에서 4,000억을 형성하는 것에 비해 현재 국내는 150억 규모에 불과하다.

이처럼 국내 프로폴리스 시장의 비성장 요인은 프로폴리스를 추출, 정제, 가공하는 기술력과 무알콜·수용화 기술부족 때문으로 일본, 호주, 중국, 브라질 등으로부터 가공원료 및 완제품을 수입에 의존하고 있다.

지금까지 유사한 기술개발 과제가 있어왔으나 에탄올 추출에 의한 에탄올 함유제품 또는 원료들로 실제로 상품화하는 데는 국내 까다로운 규제(에탄올 1% 이상은 주류로 규정함)와 난용성(물에 잘 녹지 않음), 강한 향취와 백탁 현상, 왁스성분의 부유 등으로 인해 섭취 및 소재로서의 적용성이 현저히 떨어지는 말 그대로 과제수행에 불과한 실정에 놓여 있었다고 할 수 있다.

국내 프로폴리스 시장은 2004년 8월 규제가 완화(주세법에서 제외) 이후에도 수입 완제품이 주류를 이루고 있고 이는 프로폴리스의 다양한 기능을 과학적으로 규명하고 안전하게 제품 개발해 나가는 연구 활동이 아직까지는 미비한 실정이다.

따라서, 이를 극복하기 위해서는 국산 프로폴리스 추출 및 정제법 확립, 화학적·기술적 동물실험, 임상학적 검증을 통한 연구를 중요한 과제 목표로

삼았다.

한국양봉농업협동조합에서 국산 프로폴리스를 선별, 채취하여 국내에서 시도되지 않는 당사가 개발한 무알콜·수용성 프로폴리스(WEEP 공법)의 기능성식품 원료로 협동기관인 한국원자력연구소에서 동물시험과 위탁연구기관인 울산대학교 의과대학 부속병원 서울아산병원의 IRB(임상위원회)를 거쳐 인체시험을 진행하였다.

본 연구과제에서는 식약청에서 프로폴리스 유용성표기 규정인 항산화, 항균 작용은 물론 그 사용범위를 넓히기 위하여 면역증강효과 까지 검증을 하였다.

WTO 체제 아래서 세계적인 경쟁력을 갖춘 국산 프로폴리스 원료개발을 위해서 국내 양봉농가의 산지에 따르는 프로폴리스 성분과 효과를 분석하고 이를 수용성, 무알콜 공법을 이용하여 기능성식품, 의약품, 화장품, 건강음료, 생활용품 등 에 폭 넓게 이용 할 수 있게 응용하고자 하는 것이 본 연구의 핵심이라 할 수 있습니다.

나. 개발대상기술의 중요성

본 기술 개발은 항균 및 항산화 작용을 하는 프로폴리스를 기능성식품으로서의 개발 및 양산체제를 확립하는데 있다.

최근 국내의 양봉산업은 WTO 체제 출범과 더불어 수입규제 조치가 완화되어 우리나라 시장에서 수입산 프로폴리스 제품의 유통이 늘고 있는 추세이다.

이처럼 수입 개방화 이후 회생의 길은 우수한 원료품질을 생산 할 수 있는 기술보급과 이를 이용한 고부가치의 제품이나 원료로 가공할 수 있는 기술력을 확보하는 것이라 할 수 있다.

이러한 방안의 일환으로 우선적으로 국내 산지별 생산체계의 획일화와 프로폴리스의 추출, 가공 기술의 개발과 무알콜·수용화 기술의 개발이 무엇보다도 중요하다고 할 수 있다. 프로폴리스는 단순한 항균작용만 하는 뿐 아니라 생체나 인체에 면역증강효과와 항산화작용 효과까지 지니고 있다.

프로폴리스를 함유한 Brand 제품의 개발 및 생산을 통한 실용화를 추진하여 양봉농가의 고부가가치 양봉산물의 생산으로 방향을 제시하며, 또

한 국민 건강의 증대와 국가경쟁력에 기여하고자한다.

또한 건강기능성식품에 관한 법률이 전면 시행되면서 기능성식품 또는 원료에 대한 기능성이 현재 항균기능과 항산화기능이 인정되어있다.

이에 대한 과학적 재검증도 시급히 해결해야하는 과제중의 하나이며 또한 국내외 학계로부터 연구되고 있는 면역증진기능 대한 과학적 검증을 제시함으로서 프로폴리스에 대한 유용성 표기를 확대하여 그 활용범위를 넓혀 나가야만 궁극적으로는 프로폴리스에 대한 시장을 확대해 나갈 수가 있다는 점에서 본 연구는 중요한 의의를 가진다고 할 수 있다.

제 2절 연구개발의 목표 및 내용

1. 기술개발의 최종 목표

가. 기술개발 목표

본 기술개발과제는 국산 프로폴리스의 산지별, 계절별 성분을 비교 분석함으로써 원료선별에 대한 기준을 제시하고, 국내의 건강기능식품에 관한 법률에서 정하는 기준규격과 주세법에서 규정하는 알콜도수 1도이하의 식품의 범위에 적합한 기능성식품의 생산모델을 개발한다.

이를 동물실험과 인체적용 실험 즉, 임상실험을 하여 그 기능성을 과학적으로 입증하여 유용성표기의 근거를 제시하는 한편, 세계 시장에서도 충분한 경쟁력을 가지는 원료 또는 제품으로 개발하는 것을 목표로 한다.

나. 평가방법 및 평가항목

- 1) 국내 프로폴리스의 산지별, 계절별 유효성분 함량 평가
 - Total Flavonoids 함량 평가
 - HPLC를 이용한 각각의 Flavonoid의 함량 규명
 - p-Coumaric acid, Cinnamic acid의 함량 평가
 - 계절별 프로폴리스의 *In vitro*에서의 분석
- 2) 국내 프로폴리스의 산지별 항균성 평가

- 유해균종에 대한 항균활성 억제 효과 검증
 - 항생제내성균종에 대한 항균활성 억제 효과 검증
- 3) 프로폴리스의 유효성분 추출물 증대 및 가공 공정법 개발
- 프로폴리스의 유효성분 최적추출의 조건 확립
 - 추출물 및 추출물 내의 성분 함량 비교 분석
 - 추출물의 가공적성 공정개발
- 4) *In vitro*에서의 프로폴리스의 항산화 효능 평가
- 자유라디칼 Scavenging activity 증진 효과 분석
 - Superoxide 제거 효과 분석
 - Lipidperoxidation 억제 효과 분석
 - 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상 억제 효능 평가
- 5) 실험동물(생쥐)에서의 생체손상억제 효과 평가
- 산화적 스트레스에 의한 생쥐 조직의 지질과산화 억제 효능 평가
 - 산화적 스트레스에 의한 생쥐 골수세포의 변이(micronucleus) 유발 억제효과 평가
 - 면역활성보호 및 효능 검증
- 6) 프로폴리스를 섭취한 임상실험의 혈액시료에서 항산화 및 면역활성 보호효과 평가
- 운동부하 검사를 이용하여 산화적스트레스 부가조건 설정 및 평가
: AT, VO₂max, SO₂ BP, Fitness 등, WHR, %fat
 - 혈액내의 지질과산화 억제 효과 평가 분석.(MDA)
 - 혈액내 활성산소 소거능 평가 분석.(DPPH)
 - 혈액면역세포 활성의 보호 효과측정
- 7) 국산 프로폴리스 생산시스템 도출

다. 평가 기준

평가항목	단위	개발목표치	평가방법
1. 구성성분 분석		5종 이상 분석	분석 성분 종류의 수
2. Total Flavonoids 함량		종류별 분석	기준치 없음
3. p-Coumaric acid, Cinnamic acid		확인	확인여부
4. 항균성 평가		대조군 대비 20% 이상	20 % 이상
5. 샘플채취		9개 이상 채취	9개 이상 채취
6. 유효성분 추출율		20% 이상	20 % 이상
7. 무알콜·수용화 공정개발		시작품제작	무알콜 및 수용화
8. 산지별 원료의 <i>in vitro</i> 항산화 효능 평가		대조군 대비 20% 이상	20% 이상
9. 선별된 원료의 <i>in vivo</i> 항산화 효능 평가		대조군 대비 20% 이상	20% 이상
10. MDA		대조군 대비 20% 이상	20 % 이상
11. DPPH		대조군 대비 20% 이상	20 % 이상
12. 면역세포 활성 보호		대조군 대비 20% 이상	20 % 이상

2. 연차별 연구개발의 목표와 내용

구분	연구개발 내용	연구개발 범위
1차년도 (2004)	국내 프로폴리스 현황조사	<ul style="list-style-type: none"> - 산지별, 계절별 수확량 조사 - 유효성분 함량 비교 자료 검색 - 관련 국내 논문 자료 검색 - 국내산 프로폴리스의 특성검색
	지역별 프로폴리스 채취	<ul style="list-style-type: none"> - 지역별 프로폴리스 채취 - 육안검사 기준에 의거 채취
	프로폴리스의 유효 성분 함량 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 구성성분 분석 - Total Flavonoids 함량분석 - UV/VIS Spectrophotometer 측정 - HPLC를 이용한 Flavonoid의 함량 분석 - p-Coumaric acid, Cinnamic acid의 함량 분석
	프로폴리스의 항균성 평가	<ul style="list-style-type: none"> - 유해균에 대한 항균활성 억제효과 검증 - 유해균에 대한 프로폴리스의 미생물 증식 억제 효과 검증
	<i>in vitro</i> 항산화 효 능 평가	<ul style="list-style-type: none"> - 자유라디칼 Scavenging activity 증진 효과 분석 - Superoxide 효과 분석 - Lipid peroxidation 효과 분석 - 산화적 스트레스에 의한 DNA손상 억제효능평가
	<i>In vivo</i> 항산화 효능평가	<ul style="list-style-type: none"> - 산화적 스트레스에 의한 생쥐 간조직의 지질과산화 억제효능 검증
	프로폴리스의 유효 성분 추출율 증대	<ul style="list-style-type: none"> - 프로폴리스의 유효성분 최적추출의 조건 확립 - 용매별 특성과 수율비교 - 추출율 및 추출물 내의 성분 함량 비교 분석 - 추출물의 가공적성 공정개발
	무알콜 · 수용화 공 정법 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 무알콜 · 수용화 공정법 개발

구분	연구개발내용	연구개발 범위
2차년도 (2005)	무알콜·수용화 공정 개발에 의한 시작품 제작	<ul style="list-style-type: none"> - 시작품생산 - 시작품 평가(식품공전 규격)
	시작품 <i>in vivo</i> 항산 화 효능 평가(동물실험)	<ul style="list-style-type: none"> - 산화적 스트레스에 의한 생쥐 간조직 의 지질과산화 억제 효능 검증 - 산화적 스트레스에 의한 생쥐 골수세 포의 변이 유발 억제 효능 검증 - 면역 활성 보호 효과검증
	프로폴리스를 섭취 한 임상실험의 혈액 시료에서 항산화 및 면역 활성 보호 효 과 평가	<ul style="list-style-type: none"> - 운동부하 검사를 이용하여 산화적 스트레스 부가조건 설정 및 평가 :AT, VO2max, SO2 BP, Fitness 등, WHR, %fat - 혈액내의 지질과산화 억제 효과 평가 분석(MDA) - 혈액 내 활성산소 소거능 평가 분석 (DPPH) - 면역세포의 활성화도 평가분석
	시작품의 시장성 평 가	<ul style="list-style-type: none"> - 국내외 시장성 평가 - 산업적 활용에 대한 전략 분석 - 해외 진출의 위한 전략분석 - 시장 Launching 위한 마케팅 전개방 향설정 - 가격, 포장, 홍보, 판촉 등
	국산 프로폴리스 생 산시스템 도출	<ul style="list-style-type: none"> - 국산 프로폴리스 생산시스템 도출

제 3절 연구개발의 기대효과

1. 기술적 측면

- 천연항생물질인 프로폴리스의 항균, 항산화 및 면역증강효과에 대한 유효성 규명으로 건강기능식품 프로폴리스추출물의 유효성 입증
- 국내 산지별 프로폴리스 연구를 통한 국내 양봉산업에 대한 생산 관리체계 구축의 기초자료 마련.
- 프로폴리스의 추출, 가공 기술의 개발에 따른 봉산물의 고부가치 창출
프로폴리스의 무알콜·수용화 기술의 개발로 국내 프로폴리스 산업발전 증진

2. 경제 산업적 측면

- 소비자에게 기능성식품(프로폴리스)에 대한 안전성에 대한 신뢰성 증대 기여
- 현 프로폴리스 생산체계 하에서 생산성 향상에 기여
- 국내 기능성식품시장에의 프로폴리스 제품의 활성화
- 수입대체효과 및 외화절감효과에 기여
- 천연항생제로 기존의 항생제를 대체할 수 있는 천연 소재

3. 농가파급효과

- 양봉농가소득의 증대와 국가 경쟁력 발전에 기여
- 프로폴리스의 수요증대 및 생산성 향상으로 농가소득 증대
(원료 100ton/년 \Rightarrow 100억, 제품2,000억 시장형성)
- 수입대체효과 및 외화절감효과에 기여
- 침체된 양봉산업 및 기능성식품시장의 활성화에 기여
- 봉산물을 이용한 부가가치 창출 활성화에 기여

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1절 기술개요

1. 프로폴리스의 정의와 구조

프로폴리스(봉교; 蜂膠; Propolis)는 꿀벌들이 자신들의 생존과 번식을 유지하기 위하여 여러 가지 식물들이 성장점을 보호하기 위하여 분비하는 수지(樹脂)와 같은 물질에 꿀벌 자신의 침샘 분비물과 혼합하여 만든 수지성, 점착성, 고무상의 물질이다.

벌은 자기 집을 보호하기 위해 프로폴리스를 두 가지 목적으로 사용한다. 하나는 집의 틈새 등을 발라 강화시키는 아교와 같은 사용이고, 두 번째는 박테리아 또는 바이러스 감염으로부터 집을 보호하는 용도이다.



Figure 1. 프로폴리스 채취 과정

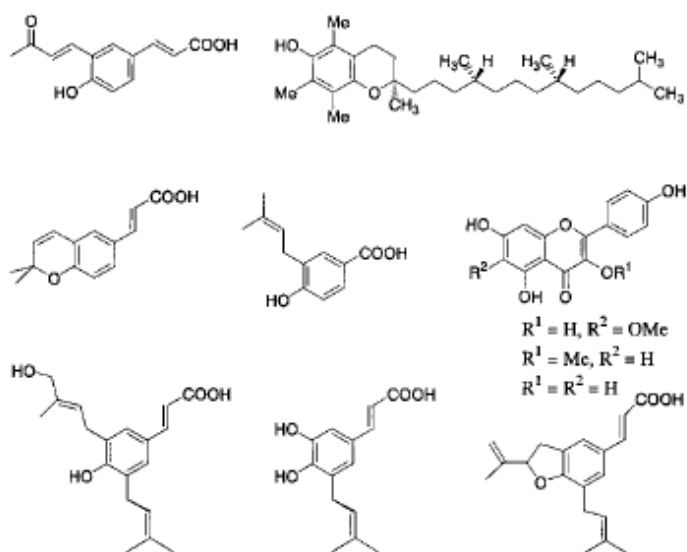
프로폴리스는 단일물질이 아니고 여러 가지 화합물로 구성된 복합물질이며, 생산 및 이용되는 프로폴리스의 구성성분은 봉장주변의 벌의 종류와 프로폴리스 분비 수목류에 따라 다르다. 일반적으로는 지금까지 약 330 여가지 화합물과 22가지 미네랄 등이 함유되어 있는 것으로 알려져 있으며 Table 1 과 같이 수지와 같은 점질상의 물질 50%-55%, 밀랍 30%, 정유 등의 유성성분 8-10%, 화분 5%, 기타 유기물 및 미네랄 등으로 이루어져 있다고 보고 되고 있다.

Table 1. 프로폴리스의 조성

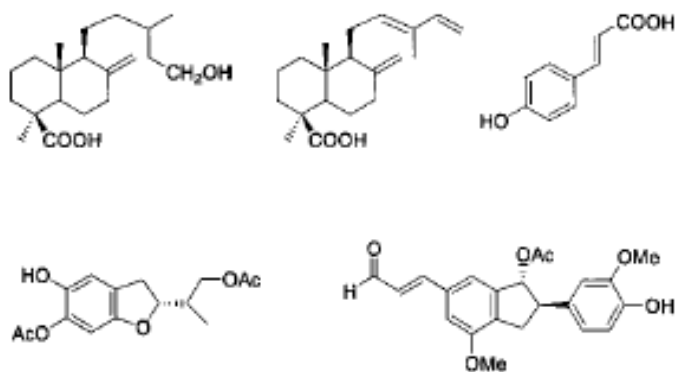
Hive propolis		Extracted propolis	
Resin	50 ~ 55 %	Protein	10.5%
Beewax	30 %	Lipid	54.0%
Essential oil	8 ~ 10 %	Carbohydrate	29.9%
Pollen	5%	Water	3.3%
		Ash	2.3%
		Total caroteine	0.24mg/100g
		Thiamin	0.18mg/100g
		Riboflavin	0.54mg/100g
		Vitamin B6	0.17mg/100g
		Niacin	1.62mg/100g

프로폴리스의 구성성분 중 가장 중요한 물질은 플라보노이드(flavonoid)라고 할 수 있는데 플라보노이드는 대부분의 식물에 존재하며 C6-C3-C6를 기본골격으로 담황색 또는 노란색을 띠고 있는 페놀계 화합물의 총칭으로서 약 500종류가 발견되었다.

Dr. Bent Harvesteen는 프로폴리스 성분 중 플라보노이드가 세균 및 바이러스 작용을 무능화시켜 면역상태와 같은 효과를 나타내므로 프로폴리스의 생리활성기능을 나타내는 가장 중요한 성분으로 플라보노이드를 학계에 보고 한 바 있다. 플라보노이드는 기능에 따라 여러 다른 종류와 구조를 가지는데, 기본골격의 2차와 3차의 산화단계의 차이에 따라서 flavonol계의 quercetin, kaempferol, myricetin이 있으며 flavone계의 apigenin, luteolin 그리고 limonin, nomilin 등이 알려져 있다.(Fig. 2)



1) 항산화 효과



2) 항균 효과

Figure 2 . 프로폴리스에서 추출한 기능에 따른 구성요소들의 화학적 조성

2. 프로폴리스의 주요작용

가) 항균·항염증 작용

프로폴리스는 기원전 3천년 전부터 고대 이집트인들의 시신의 방부제로 미이라에 사용하였고, 고대 로마병사들이 전쟁에 나갈 때 상처 치료용으로 휴대했다는 문헌들이 전해지고 있다. 히포크라테스(Hippocrates)는 상처나 궤양을 치료하는데 이 물질을 내복약으로 사용하도록 처방하였다.

보어전쟁(남아프리카전쟁, 1899~1902)에서는 프로폴리스를 글리세린과 혼합한 프로폴리신(propolisine)이 부상병을 치료하는데 이용되었다고 한다.

프로폴리스는 방사선(감마선, 자외선에도 효과적) 보호 작용, 헤르페스, 피부상처, 알레르기, 아토피성 피부염(atopic dermatitis)에 이용되었고, 피부질환 (피부종양, 사마귀, 여드름, 습진, 무좀) 및 유해균종 억제에 관해서도 많은 연구가 이루어지고 있고, 효과가 있는 것으로 보고 되고 있다.

프로폴리스 농도가 높을수록 황색포도구균, 살모넬라(Salmonella)균, 고초균, 부저병균 등에 대해서 증식 억제효과가 크다.(Fig. 3)

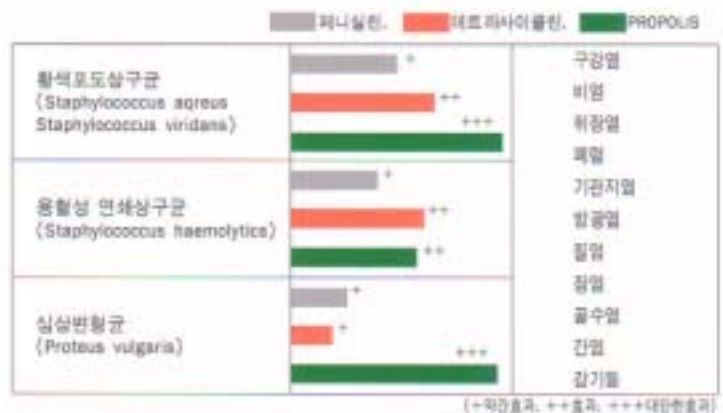


Figure 3. 병원균에 대한 프로폴리스와 항생물질 비교 분석

나) 항바이러스 살균 능력

바이러스가 원인인 인플루엔자와 헤르페스 대해서도 뛰어난 살균효과를 나타낸다.

또한 여성의 방광염과 질염의 원인이 되는 트리코모나스 와 칸디다 원충의 박멸능력이 높다고 하는데, 이것은 플라보노이드류 때문이다. 게다가 프로폴리스는 각종 항생물질의 작용에 대해서 협력효과가 있다.

다) 항산화작용 및 활성산소 억제 기능

근래에 들어 각종 질환의 병인으로서 활성산소나 free radical이 중요한 요인으로 고려되어지고 있는데 프로폴리스는 free radical의 일종인 DPPH에 대하여 강한 소거효과를 보인다.

Dr. Pascual은 종류가 다른 여러 가지 프로폴리스 모두가 특정한 화학 반응에 의해서 생기는 다른 종류의 산소radical(활성산소)에 대해서 비슷한 유형의 소거작용을 보였다고 보고하였다.

또한 프로폴리스에 함유된 플라보노이드는 수산화효소를 비롯한 효소 억제제로서 작용하여 고혈압과 동맥경화, 뇌졸중과 심장병 등의 성인병의 원인으로 보이는 과산화지질의 발생을 방어하는 것으로 알려져 있다.

프로폴리스의 DPPH radical 소거활성 및 지질과산화물 형성억제효과로 미루어 보아 강력한 항산화 효과가 인정된다. 이러한 강력한 항산화효과는 프로폴리스가 함유하고 있는 플라보노이드로 인하여 작용한다고 알려져 있다.

라) 항암작용

프로폴리스가 암을 억제하는 데 보조역할을 한다는 여러 보고가 있다. 정상 세포가 암세포화되기 전에 프로폴리스의 높은 면역력이 작용하여 암을 억제한다고 할 수 있다.(Fig. 4)

마쓰노 데쓰야(松野哲也)박사는 암환자에게 프로폴리스를 투여하여 체내 내츄럴 킬러(NK) 세포, 킬러세포, 마이크로파지가 활성화되어 항종양활동을 발휘한다 라는 BRM(Biological Response Modifier)작용에 관해서 일본 암학회 총회에서 발표하고 있다. 1992년에 Dr. Matsuno는 프로폴리스 추출물이 배양한 종양세포에 손상을 주는 것을 확인하고, 프로폴리스로부터 항종양세포 활성을 갖는 물질을 분리, 정제하였다.

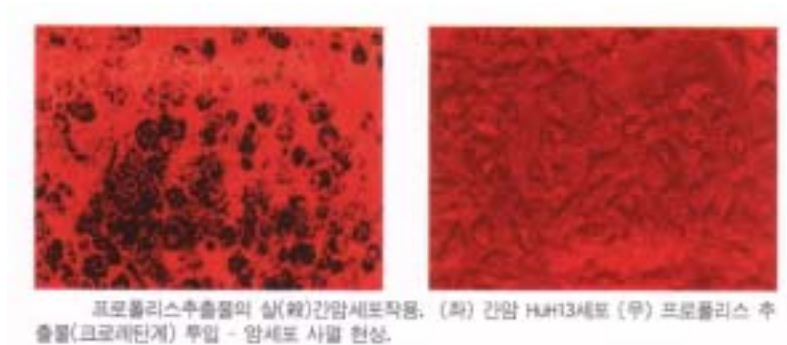


Figure 4. 프로폴리스의 살간암세포작용

3. 프로폴리스의 추출법

가) 알코올 추출법

프로폴리스의 원피(원료)를 물로 씻고, 선별한 다음 알코올(주정)로 프로폴리스를 추출하고, 여과하여 제품화한다. 알코올이 가지는 살균력으로 프로폴리스에 포함된 불순물이나 유해물질을 제거할 수가 있다. 60~70% 알코올에 의한 추출이 가장 효율이 좋고, 유효 성분인 플라보노이드류 등도 많이 추출된다.

나) 물 추출법

프로폴리스의 원피를 물로 씻고, 선별 및 건조한 다음 분쇄한다. 미세한 분말형태로 만든 다음, 활성수를 가하고, 감압 하에서 45~ 50℃가열하고, 2시간 정도 추출한다. 이를 진공 동결 건조하여 제품화한다. 미네랄과 비타민은 추출 되지만 플라보노이드류는 거의 추출되지 않는다.

다) 초임계 추출법

이산화탄소에 30~40℃ 온도로 초고압을 가하면 기체도 액체도 아닌 초임계상태가 되는데 이 초임계상태의 유체는 강한 용해능력을 가지며, 이를 이용하여 프로폴리스의 유효성분을 추출하는 방법이다.

라) 미셀화 추출법

계면활성물질을 촉매로 사용하여 프로폴리스의 미립자를 융합시켜서 체내 흡수가 좋은 프로폴리스용액을 만드는 추출법이다. 플라보노이드류는 소량 추출된다.

제 2절 국내의 기술개발현황

1. 국내외 기술개발 동향

프로폴리스는 추출, 정제의 방법에 따라 품질이 달라진다. 프로폴리스 추출 공법의 동향 및 추출된 프로폴리스에 대한 연구개발 동향을 살펴본다.

가. 프로폴리스 추출 방법에 대한 동향

프로폴리스는 수집된 원료, 즉 원괴로부터 다양한 추출법에 의하여 얻어지는 것이다. 이런 원괴는 하나의 벌집에서 약 100~200g 정도 밖에 얻을 수가 없고, 이는 로얄제리의 1/100 ~ 1/500 분량에 해당한다. 따라서 프로폴리스의 추출율을 높이기 위한 방법이 연구되고 있다.

앞서 설명한 것과 같이 프로폴리스 추출방법에는 크게 4가지가 알려져 있다. 알코올 추출법, 물 추출법, 미셀화 추출법, 초임계 추출법이 있다. 주로 많은 연구가 된 방법은 프로폴리스 알코올 추출방법에 관한 것이나 알코올 추출물은 다량의 왁스나 수지, 발삼 등이 함께 추출되어 물에 비교적 혼합이 잘되지 않아 제제화 하기가 힘들다는 단점을 갖고 있다.

이러한 단점을 보완하기 위하여 다른 추출방법의 하나로 물을 사용한 추출법이 개발되었으나 유효성분 플라보노이드 함량이 약 0.2 % 정도 낮아서 프로폴리스의 본래의 기능인 항균력과 항산화작용이 거의 발휘되지 않고 있다.

일본은 미셀화 기술을 이용하여 무알콜 프로폴리스를 추출하려 하였으나 실제로는 완전 무알콜 상태로 생산하지는 못하고 있는 실정이며 미네랄과

다당류 등은 미량 추출된다.

초임계 방법의 경우, 항암작용을 하는 테르펜류의 단일 물질만 추출되는데 비해 추출비용이 높아 대중화된 방법으로 자리 잡지 못하였다.

이처럼 각 방법들이 단점을 가지고 있음에도 불구하고, 현재까지 알려진 추출법 중에는 알코올 추출법이 프로폴리스에서 가장 중요한 유효성분 중 하나인 플라보노이드가 가장 많이 추출되는 방법이기 때문에 국제적으로도 인정되고 가장 널리 사용되고 있다. 이러한 네 가지 추출법 이외에 각국에서 프로폴리스 추출물의 알코올 함량을 낮출 수 있는 다양한 프로폴리스 추출방법들이 연구되고 있다.

나. 추출된 프로폴리스에 대한 연구 동향

현재 추출된 프로폴리스가 가지는 생리학적 기능에 대해 다각도로 연구되고 있는 상황에 대해 알아보고자 한다.

1) 프로폴리스의 성분과 제조에 관한 연구

프로폴리스 알코올 추출액은 인체에 유해한 제품이 아니더라도 과다투여를 할 경우 부작용을 일으킬 수 있다. 그리고 프로폴리스의 추출액은 항상 일정한 기술조건에 따라 만들어져야 하는데 각기 다른 추출공법에 따라 만들어진 추출액에 대한 실험결과와 효과는 각 연구기관에 따라 달라질 수 있기 때문이다.

따라서 프로폴리스에 대한 추출액의 투여량과 그 효과와의 관계를 보다 객관적이고 과학적인 증거로 제시하기 위해 그 투여량의 기준과 일정 기술조건을 정하려는 노력을 하고 있다.

또한 현재 시판되고 있는 프로폴리스의 품질(정제도, 플라보노이드 함유량)에는 제조사별로 상당한 차이가 있기 때문에 프로폴리스제품에 대한 명확한 품질기준의 제정과 제조자가 철저한 분석을 하여 그 품질규정에 따라 제조를 하여 소비자를 위한 시스템의 확립에 대해 연구 중이다.

2) 프로폴리스의 생화학적 작용에 관한 연구

프로폴리스 추출액에 의한 실험실 내 동물시험으로부터 다음과 같은 결과들이 학계에 보고 되고 있다. 혈장 내 단백질 증가, 감마 글로블린

(gamma globulin, 항체) 증가, 이화(異化)작용, 면역반응의 자극, 혈액 중 콜레스테롤 농도의 개선, 트랜스 아미나제(transaminase, 혈청 GOT, GTP), 활성 수준의 변화, 단백질, 아미노산의 총량 변화 등 이밖에 임파기관에서의 글리코겐 저하, 셀로플러스민의 활동증가 등이 프로폴리스의 작용으로 보고 되고 있다.

3) 플라보노이드의 기본적 작용과 생리적 영향에 관한 연구

인산화에 의한 효소활동의 변화, 항산화 작용, 유전자 발현의 억제와 같은 이상 3가지 효과에 의해 조절될 수 있는 항알레르기 반응, 항바이러스 반응, 진통작용, 항종양작용, 아스피린과 같은 (항염증 작용) 생리적 효과를 연구 중이다.

4) 프로폴리스 항산화작용과 조제투여에 관한 연구

프로폴리스의 항산화 작용활성은 활성산소 반응단계, 반응타입, 반응형태 등 많은 요소로부터 영향을 받게 된다.

의료현장에서는 다양한 종류의 항산화제를 혼용하여 그 효과를 높이기도 한다.

프로폴리스는 원래 다양한 항산화제의 천연혼합물이며 항산화제 상승효과를 가지고 있다. 구성성분의 상승작용은 일반적으로 유사한 작용이 복합됨으로서 기대할 수 있는 효과로서 이는 복수의 연쇄저해에 의한 것 또는 연쇄저해와 활성산소 제거작용 등의 종합적 효과이다.

5) 각종 장기(臟器)에 미치는 영향에 관한 연구

- 간 : 프로폴리스는 항산화작용뿐만 아니라 혈당치 저하와 글리코겐증가, 그리고 간보호효과를 보여준다.

- 핵산(DNA, RNA) 및 단백질 : 프로폴리스에 의한 핵산량 변화를 측정할 수 있다. 프로폴리스 추출액 투여 10일 후에 DNA양이 저하되는 것을 볼 수 있는데 이는 단백질 합성능력이 억제되기 때문이다. 플라보노이드에는 단백질 합성억제능력이 있다.

- 트랜스아미노제(아미노기 전이효소 GOP와 GPT) : GOP와 GPT는 글루타민산의 대사와 관계가 깊고 각종 장기 내에서 중요한 역할을 하는

효소이다. 프로폴리스 투여에 의해 간조직의 GOP와 GPT의 활성 및 억제
를 조절할 수 있다.

- **간인산화 효소** : 이 효소의 활성작용도 프로폴리스의 투여간격에 따
라 다양한 수치로 나타나고, 아드레날린 대사, 아스코르빈산(비타민 C)과
작용하여 상승효과를 나타낸다.

- **적혈구 침하반응** : 프로폴리스 추출액 투여 10일 후에는 적침(赤沈)반
응속도가 큰 폭으로 저하한다.

- **헤모글로빈 함량** : 프로폴리스 투여 10일 후에는 헤모글로빈이 저하
하지만 20일 후에는 다시 증가한다.

- **백혈구, 특히 임파구의 증가** : 프로폴리스에 의한 적혈구 침하반응과
백혈구의 변화는 면역반응을 자극하는 효과로 볼 수 있다. 그리고 임파구
는 혈청 글로브린을 생성하지만 그 중에서도 감마, 베타분획은 생체면역방
어시스템의 중요한 기능을 하고 있는 것으로 프로폴리스와의 상관관계가
연구 되고 있다.

이상에서 살펴 본 바와 같이 다양한 생리적 기능을 가지고 있는 프로폴
리스는 연구가치가 크다고 학자들은 보고 있다(Table 2). 향후 프로폴리스
를 연구하는 학자들은 보다 효과적인 추출방법, 조제법, 분석법, 보존방법
등을 연구하여 프로폴리스의 생물학적 레벨에서의 표준화된 기준을 마련하
는 일을 과제라고 생각하고 있다.

Table 2. 프로폴리스의 다양한 생리적 기능

생리적 기능	관 련 질 환
살균, 항균작용	구내염, 치주염, 폐렴, 방광염, 설사, 화상, 상처 등
항바이러스작용	B형·C형 간염, 감기, 인플루엔자 등
소염작용	알코올성 간염, 만성부비공염, 만성방광염 등
항알레르기, 면역조정작용	아토피성 피부염, 화분병, 천식, 류마치스 등
혈관강화, 혈액순환조절작용	고혈압, 저혈압, 빈혈, 뇌경색 후유증, 뇌혈관성 치매, 냉, 탈진
내분비, 신진대사 개선작용	당뇨병, 피로성 체중감소, 생리통, 갱년기장애 등
스트레스 완화작용	자율신경실조증, 어깨 결림 등
조직재생작용	위궤양, 궤양성 대장염, 수술 후의 회복 등
활성산소 제거작용	암, 노화방지 등
진통작용	신경통, 관절염, 말기 암 등

2. 대체기술 및 경쟁기술 동향

무알콜·수용화 기술의 경쟁 기술은 현재 세계적으로 인정되어 널리 사용되고 있는 알코올 추출법으로 볼 수 있다. 알코올 추출법의 경우 프로폴리스 제조 공정은 프로폴리스 원괴(原塊)에 식용 에탄올을 넣고 오랜 시간(6개월~3년) 숙성과정을 거쳐 여과 및 추출하는 방법이다. 현재, 알코올을 이용한 추출법이 유용성분 추출에 가장 좋은 것으로 알려져 있는데, 그 이유는 프로폴리스에 수지나 정유 등의 유성분이 많고 중요성분인 플라보노이드가 알코올에 잘 녹기 때문이다.

또한 알코올 추출법으로 추출한 프로폴리스가 적절한 생리활성 효과가 있는 것을 보여주기 위해 프로폴리스에 관한 과학적인 실험이나 데이터도

알코올로 추출된 프로폴리스로 연구한 것이 대부분이다.

이처럼 알코올 법으로 추출된 프로폴리스의 효능이 과학적으로 검증된 바, 알코올 추출법은 유효성분 추출이나 상품적 가치, 효능성 측면에서 볼 때 가장 위협적인 대체/경쟁기술이라고 할 수 도 있지만, 다양한 소재로서의 응용성과 상품적 가치의 비교에 있어서는 경쟁관계라기 보다는 새로운 시장을 창출해 나간다고 볼 수 있다.

3. 향후 기술 전망

프로폴리스는 예로부터 천연물질로서 각종 질환을 예방, 치료하는 민간 치료제로서 이용되어 왔다. 프로폴리스의 다양한 효과가 기대되었지만 그 성분이 산지(產地), 제조방법, 숙성기간 등에 따라 다르고 그 작용 또한 다양하기 때문에 프로폴리스에 대해 한마디로 정의 내리기 어려웠다.

하지만 프로폴리스의 공통적인 생리활성 기능과 안전성, 표준화에 대한 문제는 여러 해에 걸쳐 검증 및 논의되어 가고 있는 상황이다. 현재 프로폴리스는 건강증진, 염증, 심장병, 당뇨병, 암 등 각종 질병예방을 위해 의약품, 건강보조식품, 화장품, 생활용품 등으로 그 사용범위가 점점 넓어지고 있다.

따라서 다양한 제품의 상용화에 있어 무엇보다도 프로폴리스의 다양한 기능을 과학적으로 규명하고 안전하게 제품을 개발해 나가는 연구 활동이 필요하다고 할 수 있다. 이를 위해 프로폴리스 추출 및 정제 기술 개발, 원료규격의 통일에 대한 연구, 그리고 프로폴리스에 관한 화학적·생물적 연구가 계속 진행되어질 전망이다.

제 3장 연구 개발 수행 내용 및 결과

제 1절 국내 프로폴리스의 생산지별 유효성분 분석 및 효능검정을 통한 우수한 원료 선별

1. 개요

프로폴리스는 ‘pro’는 ‘방어’를 위해서, ‘polis’는 ‘도시’로 도시 앞에 있으면서 도시전체를 안전하게 지킨다는 뜻이며, 결국 벌집의 봉군을 안전하게 지키는 물질을 뜻하는 그리스어이다.

프로폴리스는 끈적끈적한 교질성의 물질로서, 꿀벌들이 수목류의 성장점 보호 물질이나 진액을 수집, 타액의 효소와 혼합하여 만드는 것으로, 벌통 내부에 발라 그들의 안전을 위해 사용되어지며, 암갈색이나 황갈색 등 여러 가지 색을 띤다. 이것은 따뜻할 때는 끈적끈적 하지만 서늘할 때는 단단해지기 때문에 꿀벌 아교(봉교, 蜂膠)라고도 한다.

수많은 식물의 꽃이나 잎, 그리고 수목들의 새순, 성장점을 보호하기 위해서 분비되는 물질과 나뭇가지의 껍질 등이 벗겨져 상처난 곳을 오염원으로부터 예방하고 미생물을 막기 위하여 분비하는 보호물질들을 꿀벌들이 모아온 것으로 이는 꿀벌들이 다양한 식물들로부터 수지상 물질을 모아 온 지성(脂性)물질이다. 수집해 온 물질과 꿀벌 타액의 효소와 혼합하여 약효가 있는 교상물질로 만들어진 것으로, propolis는 자연이 주는 신비의 천연 항생물질(Natural antibiotics)이라고 말할 수 있다.

이처럼 프로폴리스는 주위의 수집원이 되는 식물에 따라 다르기 때문에 프로폴리스의 구성 성분, 색, 향, 기능성 특성 등은 채집지역에 따라 많은 차이가 난다.

따라서 본 연구에서는 지역별 프로폴리스를 채집하고 각각의 특성과 유효성분을 분석하여, 국내산 프로폴리스의 효용가치를 높이기 위한 기초 자료를 제공하고자 한다.

2. 연구방법

가. 국내 프로폴리스 현황조사

1) 국내 프로폴리스 현황조사

위탁연구기관인 한국양봉농업협동조합의 협조와 국내외 발표된 논문, 문헌들을 통하여 국내 프로폴리스의 산지별, 계절별 수확량, 유효성분 함량 등을 조사하였고 이러한 조사를 통하여 국내산 프로폴리스의 특성도 파악할 수 있었다

2) 생산지별(수도권, 중부권, 남부권) 프로폴리스 채취

위탁연구기관인 한국양봉농업협동조합을 통하여 국내 양봉농가의 북부, 중부, 남부 지역을 선정하여 전국 18 지역에서 채취한 프로폴리스를 공급 받았다.

나. 국내 프로폴리스 유효성분함량 분석

1) Total Flavonoids 함량분석 방법 (식품공전)

프로폴리스추출물 0.1g~0.5g(ml)을 칭량하고 90% 에탄올 20ml를 가해 용해, 분리(3,000rpm, 10min)하여, 상등액을 취하고 잔류물을 80% 에탄올 8ml로 3회 추출하고 전 추출액을 합하여 80% 에탄올을 사용하여 전량을 50ml로 해서 시험용액으로 하였다. 이러한 시험용액 0.5ml를 시험관에 취하고 에탄올 1.5ml, 10% 질산알루미늄용액 0.1ml, 1M 초산칼륨용액 0.1ml, 물 2.8ml를 가하여 충분히 교반을 한다. 실온에서 40분간 정치 후 액층을 10mm 셀(cell)을 사용하여 물을 대조액으로 하여 UV/VIS Spectrophotometer (Varian, Inc. USA)를 이용해 415nm에서 흡광도를 측정한다. 시료의 흡광도로부터 별도로 상기 조작 중 질산알루미늄용액 대신 물 0.1ml를 가한 것의 흡광도를 뺀 흡광도차를 이용하여 아래의 계산식에 의해 총 플라보노이드 함량을 산출한다.

$$\text{총 플라보노이드 함량(w/w \%, 또는 w/v \%) = } \frac{a \text{ mg/ml} \times 50\text{ml}}{\text{검체의 채취량(g 또는 ml)} \times 1,000(\text{mg})} \times 100$$

2) HPLC를 이용한 유효성분의 함량 분석

각각의 propolis sample 분석은 각 시료를 10mg/ml로 용해한 후 membrane filter (Millipore, pore size 0.45 μ m)로 여과하여 20 μ L씩 HPLC (Agilent Technologies, Inc. 1100series, USA)에 주입하였다. 표준물질은 Sigma-Aldrich (U.S.A)의 Flavone, Flavanone, Chrysin, Cinnamic acid, Hesperetin, p-Coumaric acid, Caffeic acid, Quercetin을 사용하였다. 이때 사용된 HPLC분석조건은 Table 3과 같다.

Table 3. Operation conditions of HPLC for analyses of organic acids

Operation conditions	
Instrument	Agilent Technologies Inc. USA. 1100series.
Column	Inertsil ODS-3V, C18 Analytical column 5 μ m, 150 \times 4.6mm
Column Temp.	60 $^{\circ}$ C
Mobile phase	Acetic acid : Methanol : Water = 5 : 75 : 65(v/v)
Detector	UV at 254 nm
Injection volume	20 μ L
Flow rate	1.0 mL/min

3) 국산 프로폴리스의 정량적 분석

국산 프로폴리스의 효용가치를 높이기 위한 다양한 자료를 제공하기 위해 중부대학교 산학협력단 생명과학 분석센터에 의뢰하여 플라보노이드 계열 물질, 영양성분, 미네랄 등을 정량적으로 분석하였다. 더불어 국산 프로폴리스의 안전성을 확인하기 위해 대표 중금속인 납과 비소를 분석하였고, 5종의 잔류 농약과 8종의 잔류 항생물질을 분석하였다.

다. 국내 프로폴리스 항균성 평가

1) 유해균종에 대한 항균활성 억제효과 검증

가) 사용균주 및 배지

본 실험에 사용된 균주는 *Candida albicans* (KCTC 7965), *Bacillus subtilis* (KCTC 1022), *Staphylococcus aureus subsp. aureus* (KCTC 1621), *Escherichia coli* (KCTC 1682), *Salmonella typhimurium* (KCTC 2515) 등 5종으로 한국생명공학연구원 유전자은행(KTCT)에서 분양받아 사용하였으며(Table 4), 각 균주의 배지 조성은 Table 5-7 과 같다.

Table 4. The used microorganisms on experimental test

균주명	배지	생육조건
<i>Candida albicans</i> (KCTC 7965)	YM Agar	25℃
<i>Bacillus subtilis</i> (KCTC 1022)	Nutrient Agar	30℃
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> (KCTC 1621)	Trypticase Soy Agar	37℃
<i>Escherichia coli</i> (KCTC 1682)	Trypticase Soy Agar	37℃
<i>Salmonella typhimurium</i> (KCTC 2515)	Nutrient Agar	37℃

Table 5. The composition of YM Agar culture medium.

Composition	Contents
Yeast extract	3.0g
Malt extract	3.0g
Peptone	5.0g
Dextrose	10.0g
Agar	20.0g
Distilled water	1000ml

- The *Candida albicans* (KCTC 7965) of was cultured at 25±1°C

Table 6. The composition of Nutrient Agar culture medium.

Composition	Contents
Beef extract	3.0g
Peptone	5.0g
Agar	15g
Distilled water	1000ml

- The *Bacillus subtilis* (KCTC 1022) of was cultured at 30±1°C
- The *Salmonella typhimurium*(KCTC 2515) of was cultured at 37±1°C

Table 7. The composition of Trypticase Soy Agar culture medium.

Composition	Contents
Trypticase Soy broth	30g
Agar	15g
Distilled water	1000ml

- The *Escherichia coli* (KCTC 1682) of was cultured at 37±1°C
- The *Staphylococcus aureus subsp. aureus* (KCTC 1621) of was cultured at 37±1°C

나) 항균 활성실험

위에 언급한 배지를 이용하여 incubator에서 하룻밤 배양하여 접종균 주로 사용하였다. 항균 활성측정은 Disc diffusion method (paper disc : Ø 6mm, Whatman)로 측정하였다. 먼저 pour-plate method에 의해 45℃로 조제된 멸균배지 15mL에 전 배양액 0.1mL를 옮겨 잘 혼합시킨 후 지름이 8.8cm인 petri dish에 넣고 굳혔다. 여기에 paper disc를 올린 뒤 시료를 흡수시킨 다음, 배양기에서 배양하여 paper disc 주위의 clear zone의 크기로 항균 활성정도를 측정하였다.

다) 프로폴리스 시료 준비

프로폴리스의 항균 활성을 확인하기 위하여 각지에서 수집된 프로폴리스를 동일 조건으로 처리하여 표준시료를 얻었다. 프로폴리스 100g에 75% EtOH 400ml을 가하여 40℃에서 500rpm으로 교반하면서 8시간 동안 추출하였다. 추출액을 Filter paper(Whatman No. 4)를 이용해 여과하여 에탄올이 함유된 시료(EEP)로 실험에 사용하였다.

또한 위의 국산 프로폴리스(EEP)의 일부를 이용하여 Lab-scale로 무알콜·수용화 프로폴리스(WEEP)를 제조하여 실험에 사용하였다.

2) 항생제 내성 유해균종에 대한 항균활성 억제효과 검증

가) 사용균주 및 배지

본 실험에 사용된 균주는 *Escherichia coli* (CCARM 15479), *Salmonella* (CCARM 8009), *Staphylococcus aureus* (CCARM 201), *Pseudomonas aeruginosa* (CCARM 225) 등 4종으로 서울여자대학교 항생제내성균주은행(CCARM)에서 분양받아 사용하였으며(Table 8), 각 균주의 배지 조성은 Table 9-10 과 같다.

Table 8. The used microorganisms on experimental test

균주명	배지	생육조건	항생제 정보
<i>E.coli</i> (CCARM 15479)	MacConkey Agar	35℃	Ampicillin > 128 Ceftazidime : 2 Cephalothin > 128 Chloramphenicol : 64 Ciprofloxacin >128 Cefotaxime : 1 Cefoxitin : 64 Gentamicin > 128 Imipenem ≤ 0.5 Norfloxacin >128 Nalidixic acid >128 Streptocycin : 128 Tetracyclin > 128
<i>Salmonella</i> (CCARM 8009)	MacConkey Agar	35℃	Neomycin ≤ 0.5 Norfloxacin ≤ 0.5 Sulfonamides ≥ 1024 Streptomycin : 128
<i>Staphylococcus aureus</i> (CCARM 201)	Mueller Hinton Agar	37℃	Ampicillin ≤0.12 Cephalothin ≤0.12 Gentamicin ≤0.12 Norfloxacin : 0.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CCARM 225)	Mueller Hinton Agar	37℃	Ampicillin ≤0.12 Cephalothin : 8 Gentamicin : 0.25 Norfloxacin : 0.5

Table 9. The composition of MacConkey Agar culture medium.

Composition	Contents
MacConkey broth 35g,	35g
Agar	15g
Distilled water	1000ml

- ▶ The *E.coli* (CCARM 15479) of was cultured at 35±1℃
- ▶ The *Salmonella* (CCARM 8009) of was cultured at 35±1℃

Table 10. The composition of Mueller Hinton Agar culture medium.

Composition	Contents
Mueller-Hinton broth	21g
Agar	15g
Distilled water	1000ml

- ▶ The *Staphylococcus aureus* (CCARM 201) of was cultured at 37±1℃
- ▶ The *Pseudomonas aeruginosa* (CCARM 225) of was cultured at 37±1℃

나) 항균 활성실험

위에 언급한 배지를 이용하여 incubator에서 하룻밤 배양하여 접종균주로 사용하였다. 항균 활성측정은 Disc diffusion method (paper disc : Ø 6mm, Whatman)로 측정하였다. 먼저 pour-plate method에 의해 45℃로 조제된 멸균배지 15mL에 전 배양액 0.1mL를 옮겨 잘 혼합시킨 후 지름이 8.8cm인 petri dish에 넣고 굳혔다. 여기에 paper disc를 올린 뒤 시료를 흡수시킨 다음 배양기에서 배양하여 paper disc 주위의 clear zone의 크기로 항균 활성정도를 측정하였다.

3. 연구결과

가. 국내 프로폴리스 현황조사

1) 국내 프로폴리스 현황조사

국내 프로폴리스에 관한 논문과 문헌, 양봉농가의 방문 등 다양한 방법으로 국내 프로폴리스의 현황을 조사한 결과 우리나라 프로폴리스 생산 기술은 뚜렷한 것이 없으며 채취 방법은 벌통 상포 밑에 모기장이나 명석망, 방충망을 깔아 두었다가 월동 포장 시 또는 다음해 이른 봄 걷어서 비벼 털어 모으는 방법에 그치고 있었다.

프로폴리스는 서양종 꿀벌인 *Apis mellifera*에 의해서만 수집한다고 알려져 있으며, 동양종 꿀벌은 프로폴리스를 수집하지 않는다. 침없는 벌들도 유사한 점착성의 끈적이는 물질을 수집하여, 벌통의 틈새를 막고, 저장하기 위하여 꿀방과 화분방을 만든다.

일년에 봉상 당 50-60g 정도였으나, 현재는 일년에 봉상 당 수집량은 연 평균 200g 전후의 프로폴리스를 채집하고 있다. 프로폴리스는 세계 각 지역의 수목류 및 계절과 온도에 따라 수집되는 것이 다르나 주로 더운 기후에서 수집되고 있으므로 우리나라의 경우 6월 초순부터 9월까지 4개월간에 2-3회 채취하는 방법이 고품질의 프로폴리스를 다량 채취할 수 있는 것으로 보인다. 오전 10시에서 오후 3시 반경까지 나무의 눈이나 줄기에서 진액을 수집해와, 이를 침샘 효소와 혼합하여 프로폴리스를 만든다. 꿀벌 중에서는 프로폴리스만 수집해 오는 벌들이 따로 있는데, 보통의 봉군에서는 10-15마리가 프로폴리스를 수집하는 반면, 프로폴리스 수집력이 강한 봉군에서는 30-40 마리가 프로폴리스를 수집하기도 한다.

프로폴리스는 수집원이 되는 식물의 종류와 계절에 따라 다르기 때문에 프로폴리스의 구성 성분, 색, 기능성 특성 등은 채집지역에 따라 많은 차이가 있다. 프로폴리스는 25-40℃에서는 부드럽고, 유연하며, 매우 점착성이 높은 물질이다. 15℃ 이하가 되면 특히 0℃ 이하에서는 딱딱하고 거칠어진다. 45℃ 이상에서는 점점 더 끈적끈적해지고, 60-70℃ 정도에서는 용액 형태로 바뀐다. 100℃가 넘으면 녹아 변성이 일어난다.

이러한 국산 프로폴리스가 세계적인 경쟁력을 가지기 위해선 다양한 변

화가 필요할 것으로 생각된다. 가장 먼저 양봉인들이 프로폴리스에 대한 생각의 변화가 필요한 것으로 생각된다. 우리나라의 양봉인들은 꿀의 생산에만 집중하고 있으며, 프로폴리스는 일반적으로 내려오는 양봉 관리상 귀찮게만 여겨버리는 경우가 대부분이었다. 현재는 프로폴리스에 대한 관심이 상당히 높아져 프로폴리스를 채취하여 다양한 곳에 이용하고 있지만, 여전히 브라질이나 동구유럽에 비하면 취약한 실정이다. 그러므로 우리양봉 농가들도 브라질의 CONAP사(프로폴리스 생산조합)처럼 프로폴리스를 생산하고 분류하고, 판매하는 모든 것을 총괄하는 양봉농가 생산조합을 만들면 좋을 것으로 생각된다.

Table 11. 프로폴리스 생산현황

(2005년, 1\$ = 1,050)

국가	등급/함량	단가/kg/USD	금액(원)
중국	A(55%)	50	52,500
	B(45%)	40	42,000
	C(35%)	30	31,500
브라질	A(super green)	120	126,000
	B(parana green)	100	105,000
	C(small size blend)	90	94,500
	D(blend)	80	84,000
한국		72-90	76,000-90,000

또한 Table 11 에서 보이듯 프로폴리스를 품질에 따라 등급을 나누어 선별하고 가격을 책정하는 기준이 필요하다. 중국은 프로폴리스 함량에 따라 35%, 45%, 55%로 분류하고, 브라질은 프로폴리스의 품질과 색에 따라 Super green, parana green, small size blend, blend 등으로 나뉘어 각기 등급에 따른 가격을 책정하고 있다. 국산 프로폴리스도 색, 순도(프로폴리스 함량), 총 플라보노이드 함량 등 기준을 정하고 등급을 나눌 필요가 있

다. 이처럼 우리나라 프로폴리스의 생산기술의 개발과 우리나라 양봉 경영에 합리적인 프로폴리스 분류를 촉진하여 고품질의 다양한 프로폴리스를 다량 생산하여야 할 것이다. 그리고 이들 프로폴리스를 가공 부가가치를 높여 활용 시 양봉농가의 소득증대뿐만 아니라 우리나라 국민들의 보건향상에도 크게 기여할 수 있다.

이러한 의미로 국내 다양한 지역에서 생산되는 18종의 프로폴리스에 대하여 특성을 조사한 결과 수분과 왁스 함량의 평균은 각각 3.2 (± 1.22)%와 30.5(± 12.88)%이었다. 에탄올 추출 프로폴리스(Ethanol Extracted propolis, EEP)의 평균 회수율은 31.1 (± 10.87)%이었고 회수율은 왁스함량과는 유의한 상관관계로서 왁스가 많이 포함된 프로폴리스로부터 회수율은 저조하였다. Flavonoids의 함량은 평균 30.6 (± 9.62)mg/g로서 프로폴리스 회수율이 높을수록 flavonoids의 함량이 많은 경향을 보였으며 EEP(Ethanol Extract Propolis) 용액의 색이 짙은 것들은 연한 황색을 발현하는 것들보다 회수율과 flavonoids의 함량 역시 높았다.

2) 생산지별(수도권, 중부권, 남부권), 계절별로 프로폴리스 채취

위탁연구기관인 한국양봉농업협동조합을 통하여 국내 양봉농가의 북부, 중부, 남부, 지역을 선정하여(18지역) 채취한 프로폴리스를 공급받았다. 특히 강원 춘천 지역의 프로폴리스는 4종을 공급받았으며 각 지역별로 1-4kg씩 공급받았다.

북부지역(강원, 경기 북부, 서울) : 강원 춘천, 강원 화천, 강원 삼척, 경기 고양

중부지역(충남, 충북, 대전, 경기 남부, 인천) : 인천 부평, 충북 괴산, 충북 청주, 충북 충주, 충남 당진

남부지역(부산, 경남, 경북, 대구, 광주, 전남, 전북) : 부산 동래, 경북 안동, 전북 남원, 전남 광주, 전북 무주, 전북 정읍

나. 국내 프로폴리스 유효성분 함량 분석

1) 프로폴리스 시료 준비

프로폴리스의 유효성분을 분석하기 위하여 각지에서 수집된 프로폴리스

를 동일 조건으로 처리하여 표준시료를 얻었다. 프로폴리스 100g에 75% EtOH 400ml을 가하여 40℃에서 500rpm으로 교반하면서 8시간 동안 추출하였다. 추출액을 Filter paper(Whatman No. 4)를 이용해 여과하여 여과액을 진공 회전 농축기(Rotary vacuum evaporator, 50℃)로 농축한 후 동결 건조로 건조된 분말을 얻었다.(Table 12)

2) Total Flavonoids 함량분석

프로폴리스를 식품공전에 기재된 방법을 이용하여 질산알루미늄용액 0.1ml, 1M 초산칼륨용액 0.1ml과 물 2.8ml 반응시켜 UV/VIS Spectrophotometer (Varian, Inc. USA)를 이용하여 흡광도 415nm에서 총 플라보노이드를 측정하였다.(Table 13)

3) HPLC를 이용한 유효성분의 함량 분석

각 지역별 프로폴리스 시료의 다양한 색과 총 플라보노이드 함량의 차이가 프로폴리스의 성분의 차이에서 기인하는가를 알아보기 위하여 HPLC profile을 분석하여 시료의 성분구성을 개략적으로 살펴보았다.

각각의 propolis sample 분석은 각 시료를 membrane filter (Millipore, pore size 0.45μm)로 여과한 후 20μL씩 HPLC(Agilent Technologies, Inc. 1100series, USA)에 주입하였다.

먼저 표준 시료인 Hesperetin (RT 4.0min), Caffeic acid (RT 1.7min), p-Coumaric acid (RT 2.2min), Quercetin (RT 3.3min), Cinnamic acid (RT 4.5min), Chrysin (RT 11.8min), Flavone (RT 12.9min), Flavanone (RT 15.8min) 등(Sigma-aldrich, USA)을 HPLC로 분석하여 peak를 확인하였다. (Fig. 5-7)

그 후 국산 프로폴리스 시료 18종을 준비하여 표준시료와 동일한 조건으로 HPLC profile을 분석하였다. 그 결과 전반적으로 peak의 형태가 유사한 듯 보이나 각 지역 시료별로 유효성분의 함량이 모두 다른 것으로 나타났다. 국내 시료 모두 유효성분인 Hesperetin, Caffeic acid, p-Coumaric acid, Quercetin, Cinnamic acid, Chrysin, Flavone, Flavanone 등이 다량 함유되어 있으며, 이 중 Caffeic acid, Cinnamic acid, Chrysin, Flavone 등이 다른 성분에 비해 좀 더 함유된 것으로 관찰되었다. (Fig. 8-9)

Table 12. 국내산 프로폴리스의 생산 지역 및 추출물의 색상

Sample	Origin	Color
P1	Gangwon-do, Chuncheon Yaksa-dong	dark brown
P2	Gangwon-do, Chuncheon Hyoza-dong	orange yellow
P3	Gangwon-do, Hwacheon Samil-ri	dark brown
P4	Gangwon-do, Chuncheon Hupyeong-dong	dark brown
P5	Gangwon-do, Chuncheon Seosang-ri	dark brown
P6	Kyeonggi-do, Incheon Bugae-dong	dark brown
P7	Chungcheongbuk-do, Goesan Shinchon-ri	reddish yellow
P8	Gyeongsangnam-do, Pusan Oncheon-dong	dark brown
P9	Chungcheongbuk-do, Cheongju Juklim-dong	reddish yellow
P10	Chungcheongbuk-do, Chungju	reddish yellow
P11	Kyeonggi-do, Goyang Wondang	dark brown
P12	Gangwon-do, Samcheok	dark brown
P13	Gyeongsangbuk-do, Andong	reddish yellow
P14	Chungcheongnam-do, Dangjin	orange yellow
P15	Jeollabuk-do, Namwon	orange yellow
P16	Jeollanam-do, Gwangju	dark brown
P17	Jeollabuk-do, Jeongup	reddish yellow
P18	Jeollanam-do, Muju	mud yellow

Table 13. 생산지별 프로폴리스 총 플라보노이드 함량

시료명	분류	생산지	총 플라보노이드(%)
P1	C	강원도 춘천시 약사동	1.03
P2	C	강원도 춘천시 효자동	0.56
P3	C	강원도 화천시 사내면	0.03
P4	C	강원도 춘천시 후평동	0.14
P5	C	강원도 춘천시 서면	0.42
P6	B	인천시 부평동	0.70
P7	B	충북 괴산군 장연면	0.56
P8	A	부산시 동래구	0.63
P9	B	충북 청주시	0.73
P10	B	충북 충주시	0.90
P11	C	경기도 고양시 원당면	0.97
P12	C	강원도 삼척시	1.06
P13	A	경북 안동시	1.21
P14	B	충남 당진시	0.89
P15	A	전북 남원시	1.11
P16	A	전남 광주시	0.76
P17	A	전북 무주시	0.44
P18	A	전북 정읍시	0.60

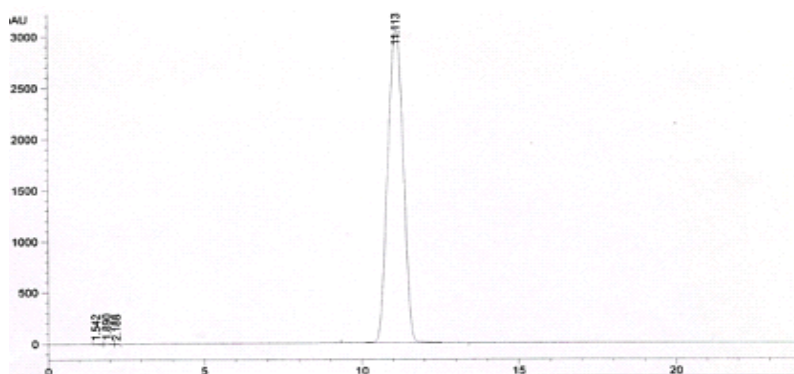
남부지역(A) : 부산, 경남, 경북, 대구, 광주, 전남, 전북

중부지역(B) : 충남, 충북, 대전, 경기 남부, 인천

북부지역(C) : 강원, 경기 북부, 서울



Caffeic acid



Chrysin

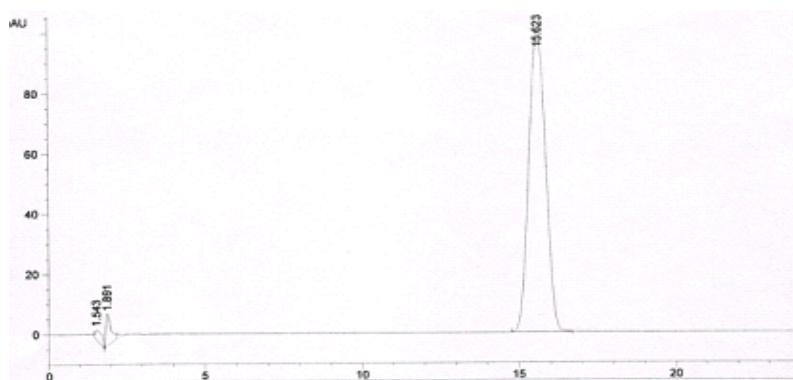


Cinnamic acid

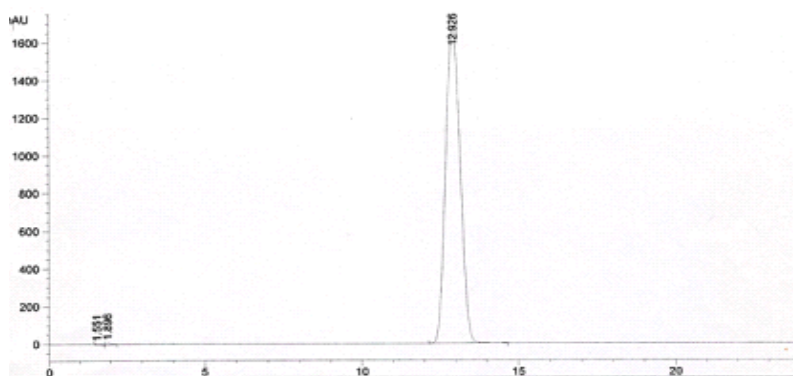
Figure 5. Chromatographic profiles acquired by HPLC of standard compound.



Coumaric-acid

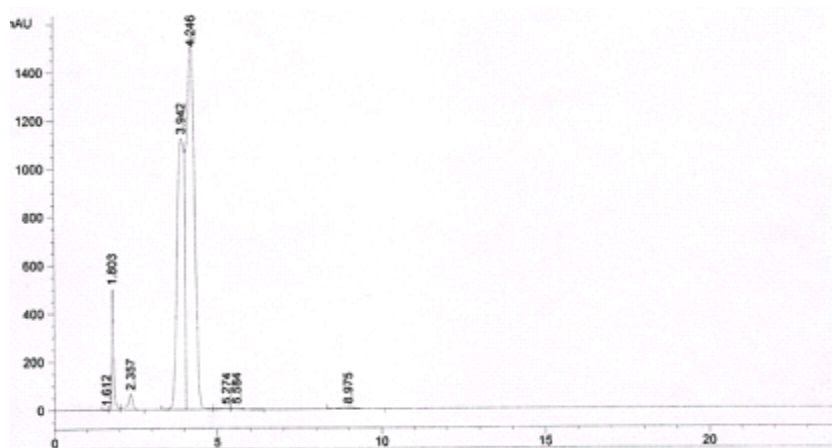


Flavonone

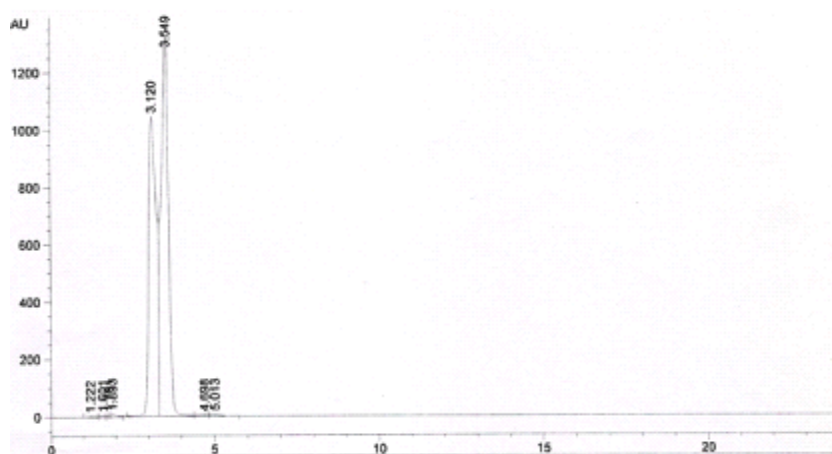


Flavone

Figure 6. Chromatographic profiles acquired by HPLC of standard compound.

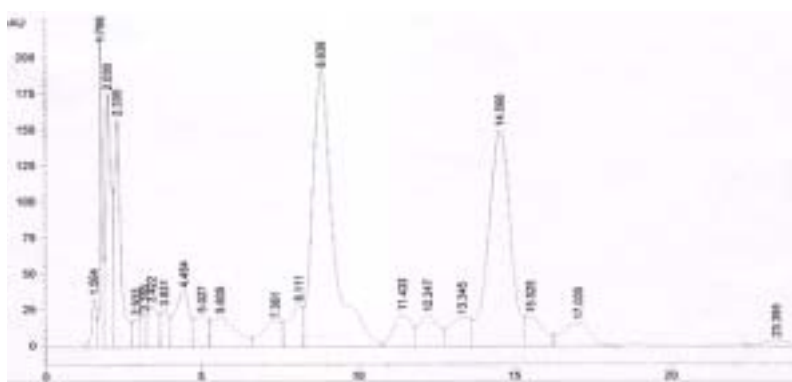


Hesperetin

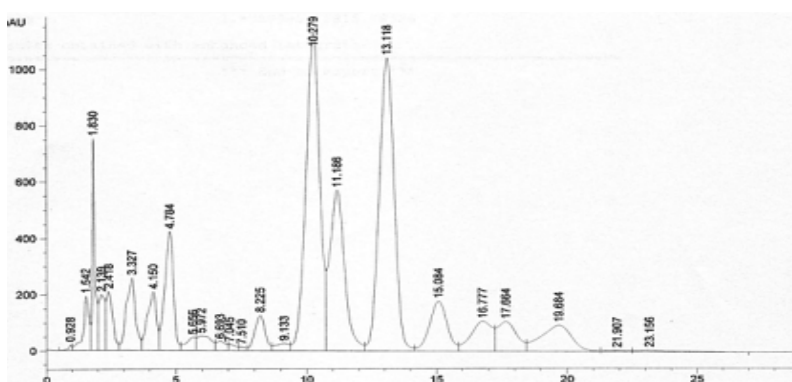


Quercetin

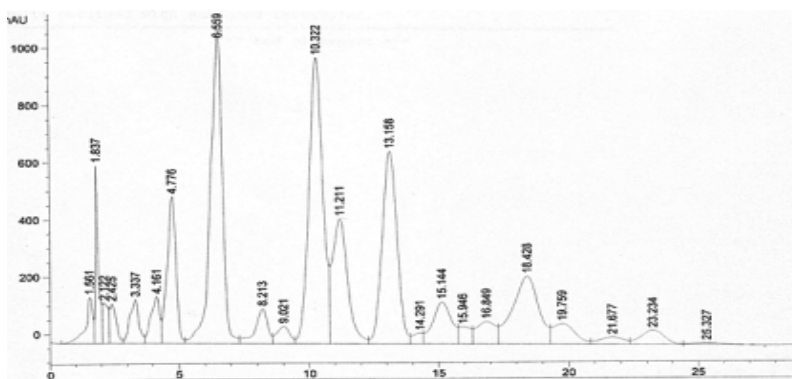
Figure 7. Chromatographic profiles acquired by HPLC of standard compound.



P5

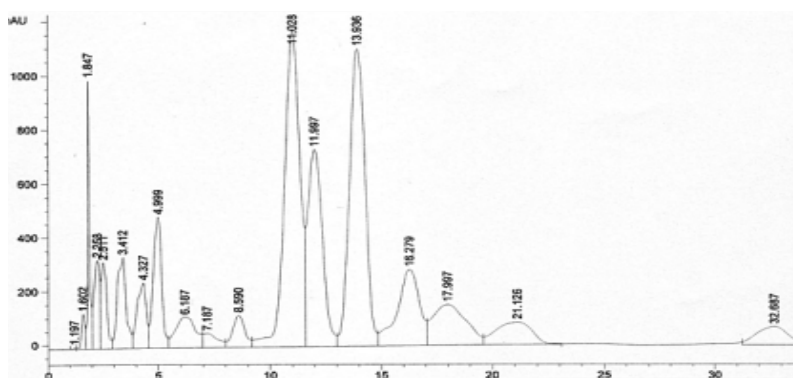


P7

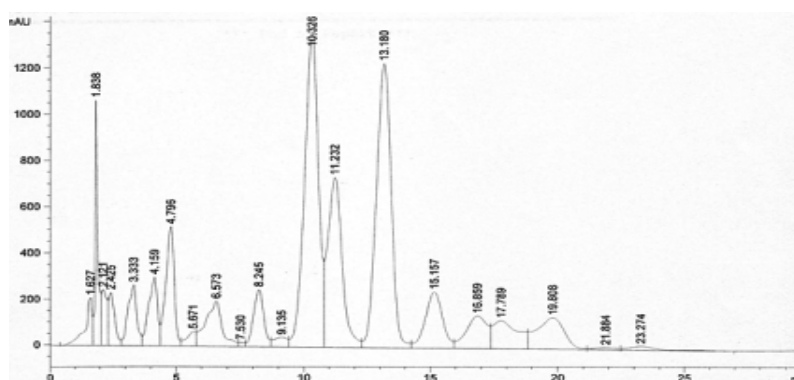


P8

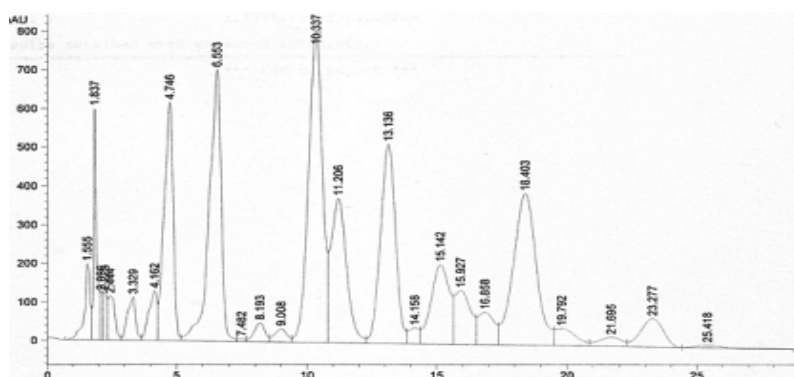
Figure 8. Chromatographic profiles acquired by HPLC of Korea propolis sample.



P12



P16



P17

Figure 9. Chromatographic profiles acquired by HPLC of Korea propolis sample.

3) 국내산 프로폴리스 정량적 분석

국산 프로폴리스 시료를 중부대학교 산학협력단 생명과학분석센터에 의뢰하여 플라보노이드 계열 물질, 영양성분, 미네랄 등을 정량적으로 분석하였다. Table 14 에서 보여주는 바와 같이 국산 프로폴리스는 Caffeic acid, Coumaric acid, Quercetin, Chrysin, Flavone 등의 플라보노이드 계열 물질을 다양하게 함유하고 있으며 탄수화물, 단백질, 지방 등의 영양성분(Table 15)과 미네랄 성분(Table 16)도 다량 함유하고 있다.

더불어 국산 프로폴리스의 안전성을 확인하기 위해 대표 중금속인 납과 비소를 분석하였고, 5종의 잔류 농약과 8종의 잔류 항생물질을 분석하였다. Table 17 에서 보여지 듯 비소의 경우 모두 다 검출되지 않아 안전한 반면 납의 경우 기준치인 5ppm이 넘게 검출된 샘플이 4개나 있어 주의가 필요하다. 잔류 농약(Table 18)과 잔류 항생물질(Table 19)도 대다수 샘플들에선 검출되지 않았지만 Dieldrin, Endrin 등의 농약과 Oxytetracycline, sulfa- monomethazine, Penicillin G 등의 항생물질에 미량씩 검출되는 시료가 있어 안전성에 대한 주의가 필요하다.

Table 14. 국산 프로폴리스 플라보노이드 물질(mg/g) 정량 분석

	Caffeic acid	Coumaric acid	Quercetin	Chrysin	Flavone
P1	8.42	5.15	1.39	34.98	0.46
P2	3.86	1.77	0.81	0.61	0.35
P5	4.04	22.75	0.50	0.30	0.37
P6	4.42	0.68	0.86	1.04	0.36
P7	4.46	0.98	0.85	1.08	0.33
P8	4.73	0.74	0.95	17.10	ND
P9	8.40	8.02	1.33	22.40	0.45
P10	6.61	3.99	1.24	23.33	0.44
P11	6.25	1.84	0.97	18.07	ND
P12	9.25	1.68	1.22	2.28	0.43
P13	9.35	7.07	1.14	2.31	0.37
P14	3.92	ND	0.82	12.87	0.36
P15	13.94	3.54	1.60	2.99	0.46
P16	5.09	3.73	0.94	17.42	0.39
P18	3.27	ND	0.60	1.74	0.37

ND : Not detected

Table 15. 국산 프로폴리스 영양성분(%) 분석

	단백질	지방	섬유질	탄수화물
P1	3.00	81.45	1.72	10.83
P9	1.41	86.72	1.36	8.99
P12	1.41	86.72	1.42	8.99
P13	1.41	87.31	1.53	8.34
P15	1.33	91.49	1.68	4.76

Table 16. 국산 프로폴리스 미네랄 (mg/100g) 분석

	Mn	P	Fe	Ca	K	Mg	Cu	Na
P1	1.84	33.36	13.26	78.88	37.97	0.61	4.67	24.45
P9	2.58	55.42	30.24	112.53	52.42	10.48	6.76	41.70
P12	4.36	49.70	5.44	108.54	72.84	8.90	22.90	47.52
P13	2.91	26.48	5.82	75.80	49.51	8.87	19.63	43.54
P15	0.51	20.00	-	12.45	21.98	0.51	4.44	15.30

Table 17. 국산 프로폴리스 중금속 (ppm) 분석

	납	비소
P1	2.09	ND
P2	2.94	ND
P5	6.07	ND
P6	6.86	ND
P7	ND	ND
P8	1.97	ND
P9	6.42	ND
P10	ND	ND
P11	3.96	ND
P12	13.4	ND
P13	3.42	ND
P14	2.76	ND
P15	2.70	ND
P16	ND	ND
P18	ND	ND

ND : Not detected

Table 18. 국산 프로폴리스 잔류농약 분석

	DDT	BHC	Aldrin	Dieldrin	Endrin
P1	ND	ND	ND	ND	ND
P2	ND	ND	ND	ND	ND
P5	ND	ND	ND	ND	ND
P6	ND	ND	ND	0.02ppm	ND
P7	ND	ND	ND	ND	ND
P8	ND	ND	ND	ND	ND
P9	ND	ND	ND	ND	ND
P10	ND	ND	ND	ND	ND
P11	ND	ND	ND	ND	0.07ppm
P12	ND	ND	ND	ND	ND
P13	ND	ND	ND	ND	ND
P14	ND	ND	ND	ND	ND
P15	ND	ND	ND	ND	ND
P16	ND	ND	ND	ND	ND
P18	ND	ND	ND	ND	ND

ND : Not detected

Table 19. 국산 프로폴리스 잔류항생물질 분석

	Tetra cycline	Oxy tetra cycline	chloro tetra cycline	sulfa- dimethazine	sulfa- mono methazine	sulfa- quinoxaline	Ampicillin	Penicillin G
P1	ND	0.13ppm	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P9	ND	0.33ppm	ND	ND	0.27ppm	ND	ND	ND
P10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P12	ND	ND	ND	ND	0.22ppm	ND	ND	ND
P13	ND	ND	ND	ND	0.18ppm	ND	ND	ND
P14	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.18ppm
P15	ND	ND	0.02ppm	ND	ND	ND	ND	ND
P16	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.14ppm
P18	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND : Not detected

다. 국내 프로폴리스 항균활성 평가

1) 유해균종에 대한 항균활성 억제효과 검증

프로폴리스의 항균활성을 측정하기 위하여 5종의 유해균종을 선별하였다. 인체나 동물의 입안·피부 등에 존재하며, 정상상태에서는 인체에 무해하나 항생물질을 장기 사용하거나, 인체가 면역에 대항력이 약해졌을 때에 체내(입안과 음부(陰部) 등의 점막)에서 이상 번식을 하여, 점막이 깃무르거나 손톱, 발톱에 생기는 조각 백선(무좀)을 일으키는 진균인 *Candida albicans*를 선별하였다.

그람 음성(Gram negative group)의 세균들 중 많은 연구를 통해 가장 많이 알려졌으며, 사람이나 동물의 장에 존재하며, 설사 등을 유발하는 병원성을 지니고 있고 때로는 방광염, 담낭염, 신우염, 신우신증, 패혈증, 수막염 등을 일으킬 수 있는 *Escherichia coli* 와 식품의 부패 원인균으로 그람 양성(Gram positive group)균 중 가장 많이 연구된 세균중 하나인 *Bacillus subtilis*를 선별하였다.

또한 식품과 물에 의해 전염되는 세계적으로 알려진 식중독 미생물인 *Salmonella typhimurium*과 식중독을 포함하여 여러 가지 감염증을 일으키는 가장 중요한 균종인 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)을 선별하여 항균활성을 측정해 보았다.

Table 20 에서 보여지 듯 프로폴리스는 5종 모두에 항균활성을 나타내며, 생산지별로 차이는 있지만 전반적으로 *Bacillus subtilis* (KCTC 1022)에 대한 활성이 가장 높고, *Salmonella typhimurium* (KCTC 2515), *Candida albicans* (KCTC 7965)에도 높은 활성을 나타내었다.(Fig. 10-14) 또한 에탄올 추출 프로폴리스 보다 무알콜·수용화 프로폴리스에서 더 높은 항균활성을 나타냄을 볼 수 있다. 이는 무알콜 수용성 프로폴리스가 잘 확산(diffusion)되고, 균체에 잘 침투(infiltrate)되어 항균활성이 높게 나타나는 것으로 보인다.

Table 20. Antifungal activity by Korea Propolis extract

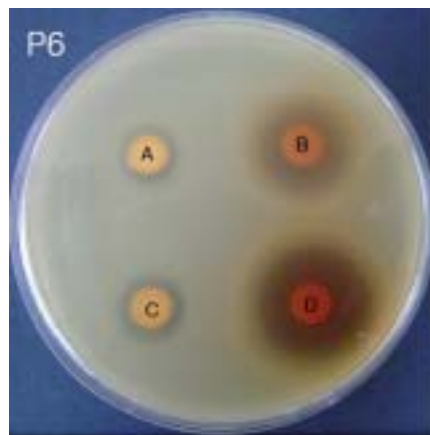
	<i>Bacillus subtilis</i> (KCTC 1022)		<i>Salmonella typhimurium</i> (KCTC 2515)		<i>Candida albicans</i> (KCTC 7965)		<i>Escherichia coli</i> (KCTC 1682)		<i>Staphylococcus aureus</i> (KCTC 1621)	
	EEP	WEEP	EEP	WEEP	EEP	WEEP	EEP	WEEP	EEP	WEEP
P1	+	++++	-	+	+	++	-	++	+	++
P2	+	++++	-	+	+	++	+	+	++	+
P3	+++	-	+	-	-	-	-	-	-	-
P4	++	++++	+	++	-	++	+	++	++	-
P5	+	++++	-	++	-	++	+	+	-	++
P6	++	++++	-	++	+	++	+	+	+	++
P7	++	++++	-	++	-	++	-	-	+	+
P8	++	++++	-	++	+	++	-	+	+	++
P9	++	++++	-	++	+	++	-	+	+	+
P10	++	++++	-	++	+	++	-	+	+	+
P11	++	++++	-	++	+	++	-	+	+	+
P12	++	++++	-	+	++	++	-	+	+	+
P13	++	++++	-	++	+	+++	-	+	+	+
P14	++	++++	-	++	+	+++	-	+	+	+++
P15	++	++++	-	++	-	++	-	-	+	+++
P16	++	++++	-	++	+	++	-	-	+	+
P17	+++	++++	-	++	-	++	-	-	+	-
P18	++	++++	-	++	+	+++	-	-	+	+

Inhibition zone size

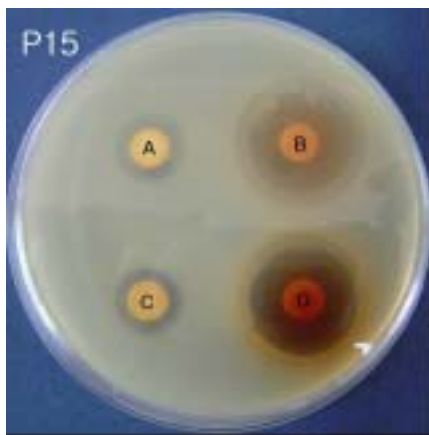
: + < 10mm, 10mm < ++ < 15mm, 15mm < +++ < 20mm, 20mm < ++++



P2 : 강원도 춘천시 효자동
 A : EEP 10mg B : WEEP 10mg
 C : EEP 20mg D : WEEP 20mg



P6 : 인천시 부평구 부개동
 A : EEP 10mg B : WEEP 10mg
 C : EEP 20mg D : WEEP 20mg

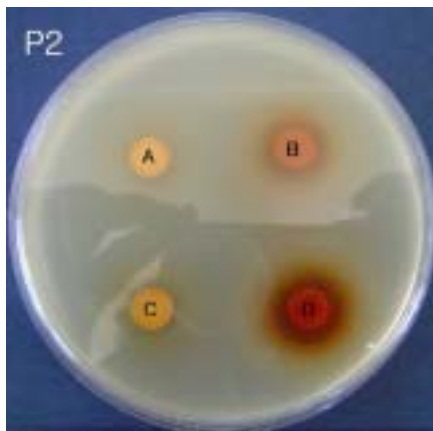


P15 : 전북 남원시
 A : EEP 10mg B : WEEP 10mg
 C : EEP 20mg D : WEEP 20mg

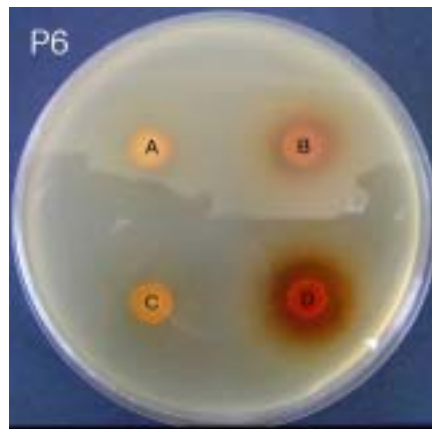


P8 : 부산시 동래구 온천동
 A : EEP 10mg B : WEEP 10mg
 C : EEP 20mg D : WEEP 20mg

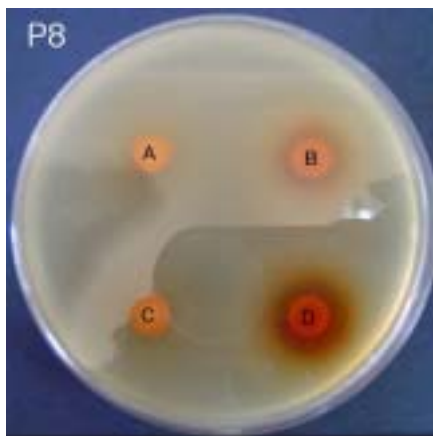
Figure 10. Comparison of inhibitory zone formation by Korea Propolis extract at *Bacillus subtilis* (KCTC 1022)



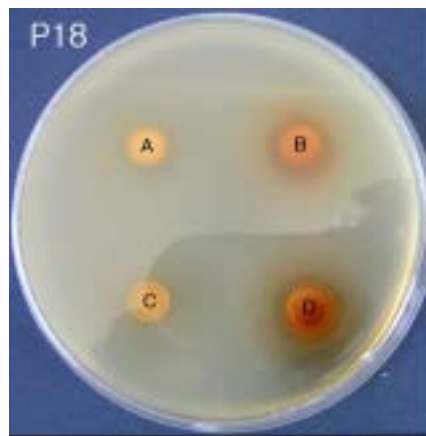
P2 : 강원도 춘천시 효자동
A : EEP 10mg B : WEEP 10mg
C : EEP 20mg D : WEEP 20mg



P6 : 인천시 부평구 부개동
A : EEP 10mg B : WEEP 10mg
C : EEP 20mg D : WEEP 20mg

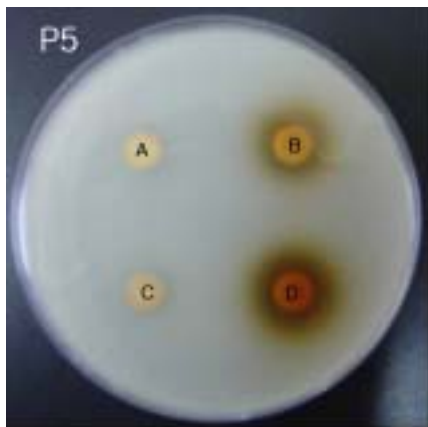


P8 : 부산시 동래구 온천동
A : EEP 10mg B : WEEP 10mg
C : EEP 20mg D : WEEP 20mg

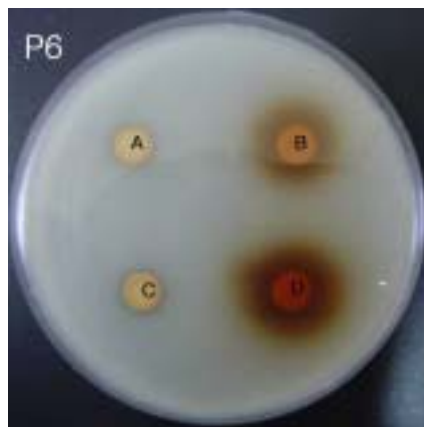


P18 : 전북 정읍시
A : EEP 10mg B : WEEP 10mg
C : EEP 20mg D : WEEP 20mg

Figure 11. Comparison of inhibitory zone formation by Korea Propolis extract at *Salmonella typhimurium* (KCTC 2515)



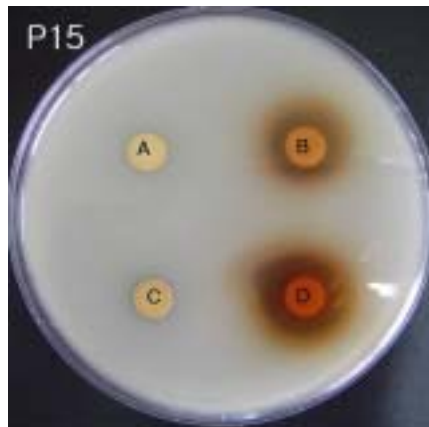
P5 : 강원도 춘천시 서면
 A : EEP 10mg B : WEEP 10mg
 C : EEP 20mg D : WEEP 20mg



P6 : 인천시 부평구 부개동
 A : EEP 10mg B : WEEP 10mg
 C : EEP 20mg D : WEEP 20mg

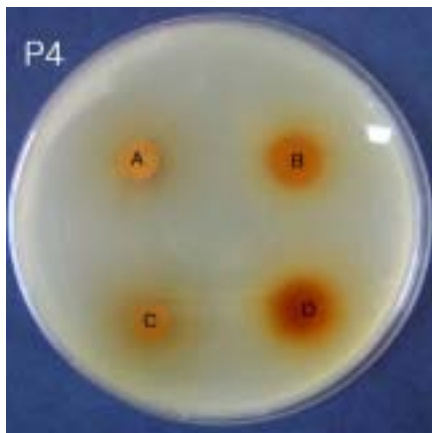


P8 : 부산시 동래구 온천동
 A : EEP 10mg B : WEEP 10mg
 C : EEP 20mg D : WEEP 20mg

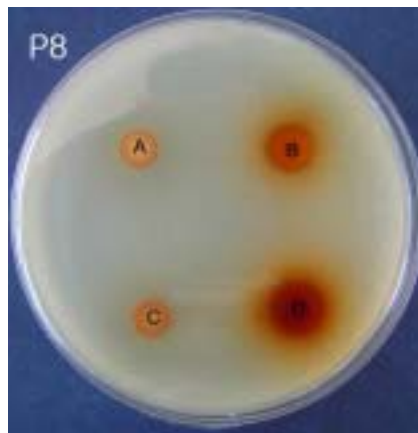


P15 : 전북 남원시
 A : EEP 10mg B : WEEP 10mg
 C : EEP 20mg D : WEEP 20mg

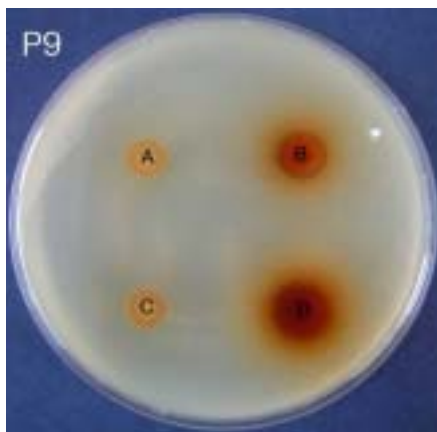
Figure 12. Comparison of inhibitory zone formation by Korea Propolis extract at *Candida albicans* (KCTC 7965)



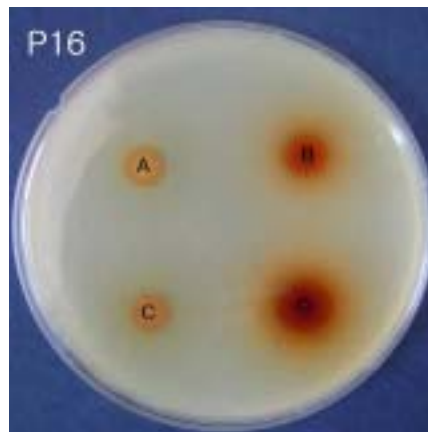
P4 : 강원도 춘천시 후평동
 A : EEP 10mg B : WEEP 10mg
 C : EEP 20mg D : WEEP 20mg



P8 : 부산시 동래구 온천동
 A : EEP 10mg B : WEEP 10mg
 C : EEP 20mg D : WEEP 20mg

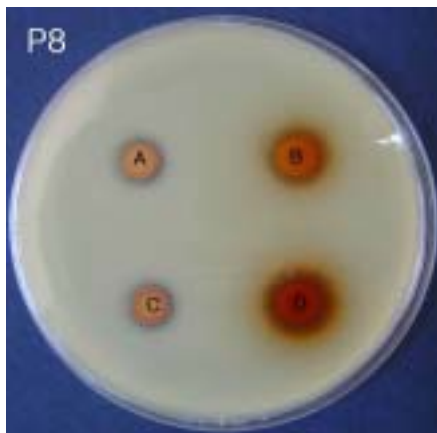


P9 : 충북 청주시 흥덕구
 A : EEP 10mg B : WEEP 10mg
 C : EEP 20mg D : WEEP 20mg

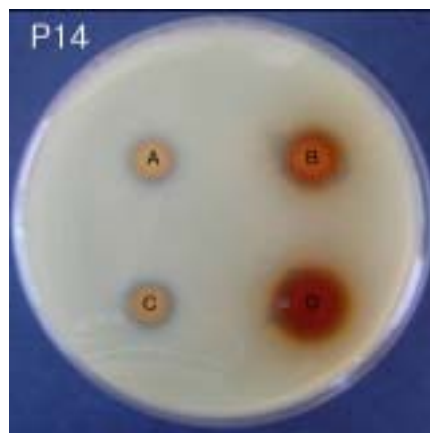


P16 : 전남 광주시
 A : EEP 10mg B : WEEP 10mg
 C : EEP 20mg D : WEEP 20mg

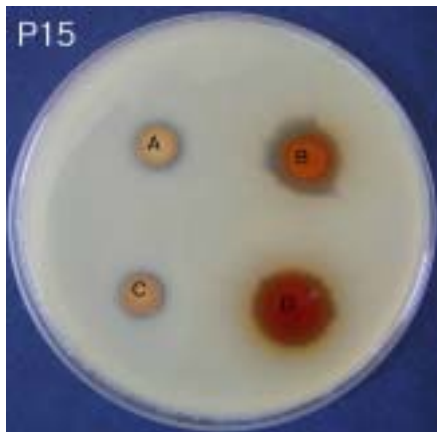
Figure 13. Comparison of inhibitory zone formation by Korea Propolis extract at *Escherichia coli* (KCTC 1682)



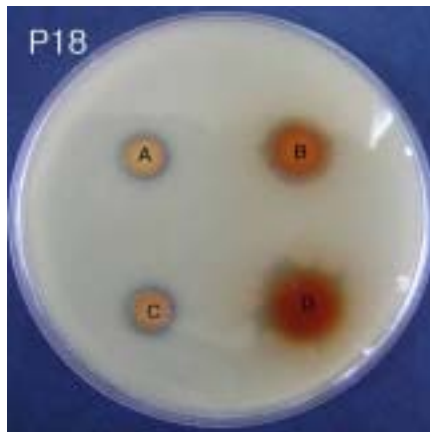
P8 : 부산시 동래구 온천동
 A : EEP 10mg B : WEEP 10mg
 C : EEP 20mg D : WEEP 20mg



P14 : 충남 당진시
 A : EEP 10mg B : WEEP 10mg
 C : EEP 20mg D : WEEP 20mg



P15 : 전북 남원시
 A : EEP 10mg B : WEEP 10mg
 C : EEP 20mg D : WEEP 20mg



P18 : 전북 정읍시
 A : EEP 10mg B : WEEP 10mg
 C : EEP 20mg D : WEEP 20mg

Figure 14. Comparison of inhibitory zone formation by Korea Propolis extract at *Staphylococcus aureus* (KCTC 1621)

2) 항생제 내성 유해균종에 대한 항균활성 억제효과 검증

2차 세계대전이 한창이던 1940년대 초, 역사 앞에 등장한 페니실린은 인류의 희망이자 영웅이었다. 사람들은 이제 박테리아로 인한 죽음의 위협에서 해방됐다고 생각했다. 그러나 불과 1년 만에 박테리아는 페니실린의 공격을 무력화시키는 능력, 즉 내성(耐性)을 지니게 됐다. 아목시실린, 암피실린, 세파렉신, 반코마이신 등 수많은 ‘고성능’ 항생제가 개발됐지만, 그때마다 박테리아는 내성을 획득해 인류를 위협하고 있다. 내성균의 출현과 확산은 갈수록 빨라져 이 추세가 계속된다면 항생제가 개발되기 이전 시대로 돌아갈 수 있다고 전문가들은 경고한다. 병도 아니라고 여겼던 폐렴, 임질, 중이염, 결핵 등이 불치병으로 돌변해 생명을 빼앗는 일이 벌어진다는 것이다.

항생제 처방 세계2위인 우리나라 역시 세균의 항생제 내성문제가 전세계적에서 가장 심각하다는 사실은 이미 알려진 사실이다. 이처럼 사회적으로 문제가 되고 있는 항생제 내성 균주들에 대해 프로폴리스가 활성 억제 작용을 갖는지 알아보기 위하여 서울여자대학교 항생제내성균주은행으로부터 항생제에 내성을 갖는 균주 4종을 분양받아 실험하였다.

일반적으로 많이 사용되는 Ampicillin, Neomycin, Norfloxacin, Streptomycin 등 다양한 항생제에 내성을 갖는 *Staphylococcus aureus* (CCARM 201), *Pseudomonas aeruginosa* (CCARM 225), *Salmonella* (CCARM 8009), *Escherichia coli* (CCARM 15479)을 분양 받아 항균활성을 측정한 결과 프로폴리스가 항생제 내성균주에서도 활성을 나타냄을 확인 할 수 있었다.

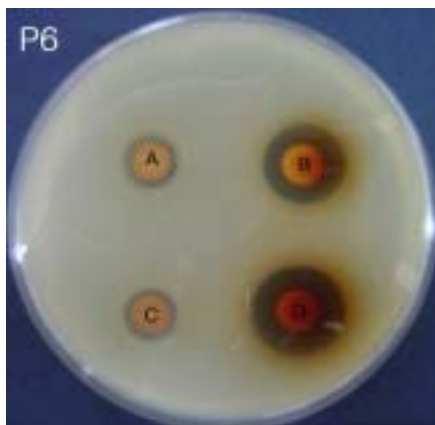
Table 21 에서 나타난 것처럼 생산지별로 차이는 있지만 전반적으로 식중독을 포함하여 여러 가지 감염증을 일으키는 황색포도상구균인 *Staphylococcus aureus* (CCARM 201)와 병원 내에서의 검출율이 높고 다른 그람 음성균에 비하여 저항력이 매우 강하며 수막염, 폐질환, 안질환, 중이염, 창상, 화상, 농양에서도 감염되거나 혼합 감염을 일으키는 녹농균 *Pseudomonas aeruginosa* (CCARM 225)에 대해 높은 활성을 나타냈다.(Fig. 15-18) 또한 일반 유해균과 같이 에탄올 추출물 보다 무알콜·수용성 프로폴리스가 더 높은 항균활성을 나타내었다.

Table 21. Antifungal activity by Korea Propolis extract

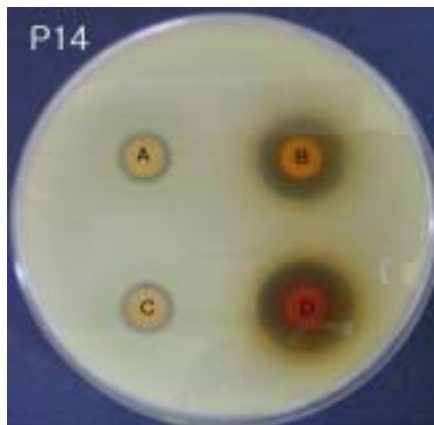
	<i>Staphylococcus aureus</i> (CCARM 201)		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CCARM 225)		<i>Salmonella</i> (CCARM 8009)		<i>Escherichia coli</i> (CCARM 15479)	
	EEP	WEEP	EEP	WEEP	EEP	WEEP	EEP	WEEP
P1	++	-	+	-	-	-	-	-
P2	+	+++	+	++	-	-	-	+
P3	+	+	++	+	-	-	-	-
P4	-	+++	+	+++	-	-	+	+
P5	-	++	+	++	-	-	-	++
P6	+	+++	++	+++	-	-	-	-
P7	+	++	+	++	-	-	-	++
P8	++	+++	++	+++	-	++	-	+
P9	+	++	+	++	-	++	-	+
P10	+	++	+	++	-	-	-	++
P11	+	++	+	++	-	-	-	+
P12	+	-	+	-	-	-	-	++
P13	++	-	++	-	-	-	-	+
P14	+	+++	+	+++	-	-	-	+
P15	++	+++	+	+++	-	-	-	+
P16	++	++	+	++	-	-	-	+
P17	+	+++	++	+++	-	-	-	++
P18	++	+++	++	+++	-	-	-	++

Inhibition zone size

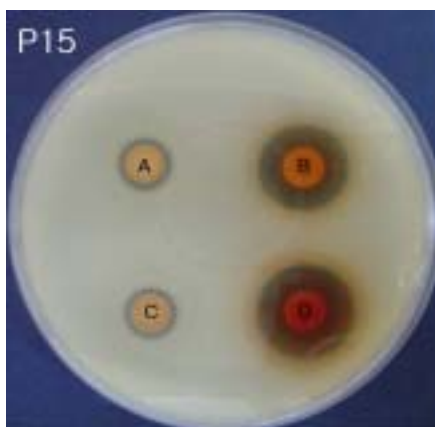
: + < 10mm, 10mm < ++ < 15mm, 15mm < +++ < 20mm, 20mm < ++++



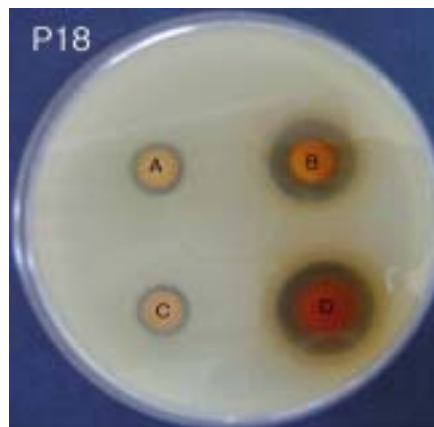
P6 : 인천시 부평구
A : EEP 10mg B : WEEP 10mg
C : EEP 20mg D : WEEP 20mg



P14 : 충남 당진시
A : EEP 10mg B : WEEP 10mg
C : EEP 20mg D : WEEP 20mg

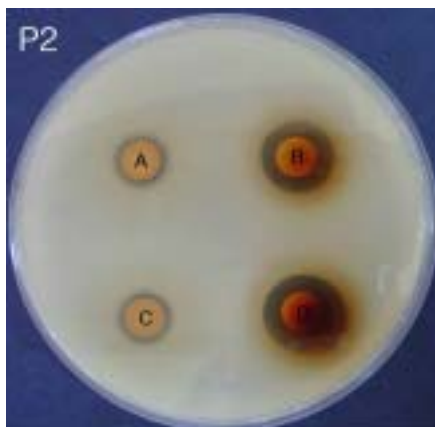


P15 : 전북 남원시
A : EEP 10mg B : WEEP 10mg
C : EEP 20mg D : WEEP 20mg

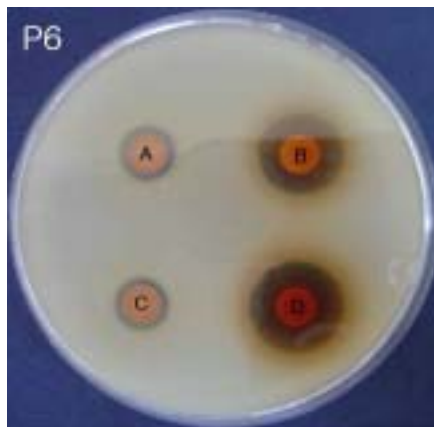


P18 : 전북 정읍시
A : EEP 10mg B : WEEP 10mg
C : EEP 20mg D : WEEP 20mg

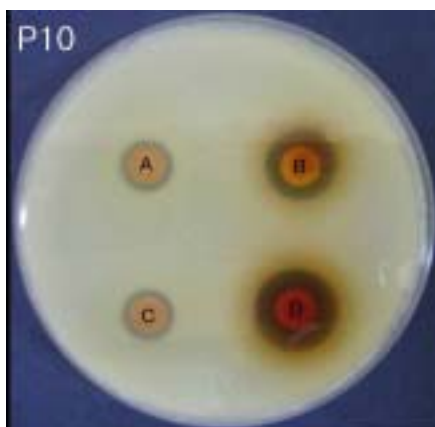
Figure 15. Comparison of inhibitory zone formation by Korea Propolis extract at *Staphylococcus aureus* (CCARM 201)



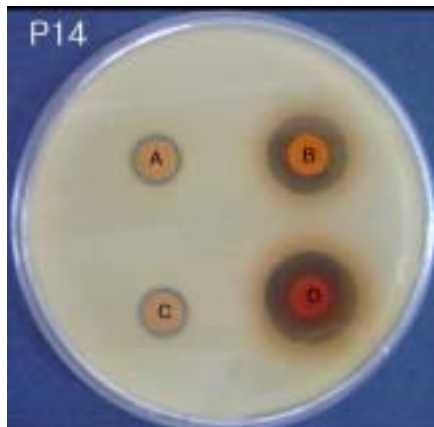
P2 : 강원도 춘천시 효자동
 A : EEP 10mg B : WEEP 10mg
 C : EEP 20mg D : WEEP 20mg



P6 : 인천시 부평구
 A : EEP 10mg B : WEEP 10mg
 C : EEP 20mg D : WEEP 20mg

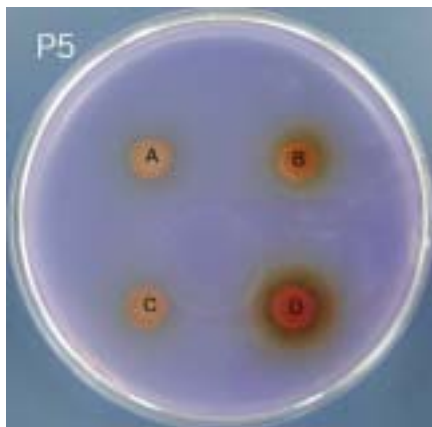


P10 : 충북 충주시
 A : EEP 10mg B : WEEP 10mg
 C : EEP 20mg D : WEEP 20mg

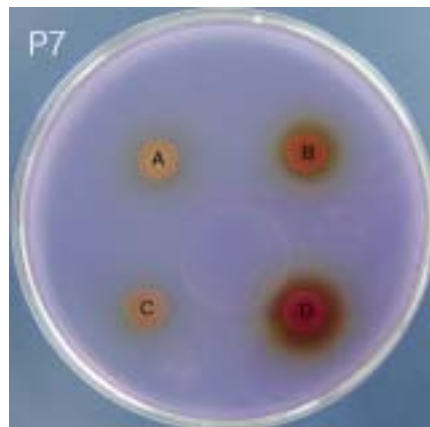


P14 : 충남 당진시
 A : EEP 10mg B : WEEP 10mg
 C : EEP 20mg D : WEEP 20mg

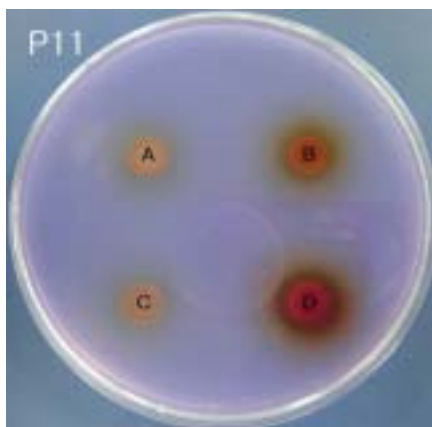
Figure 16. Comparison of inhibitory zone formation by Korea Propolis extract at *Pseudomonas aeruginosa* (CCARM 225)



P5 : 강원도 춘천시 서면
A : EEP 10mg B : WEEP 10mg
C : EEP 20mg D : WEEP 20mg



P7 : 충북 괴산군 장연면
A : EEP 10mg B : WEEP 10mg
C : EEP 20mg D : WEEP 20mg

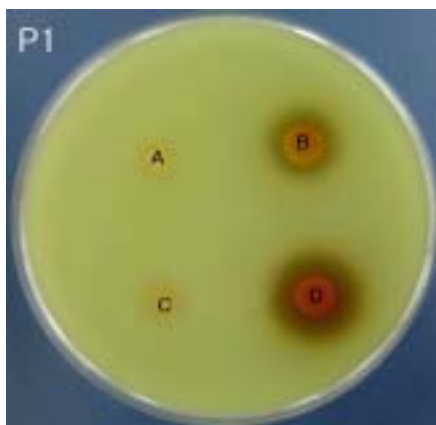


P11 : 경기도 고양시 원당면
A : EEP 10mg B : WEEP 10mg
C : EEP 20mg D : WEEP 20mg

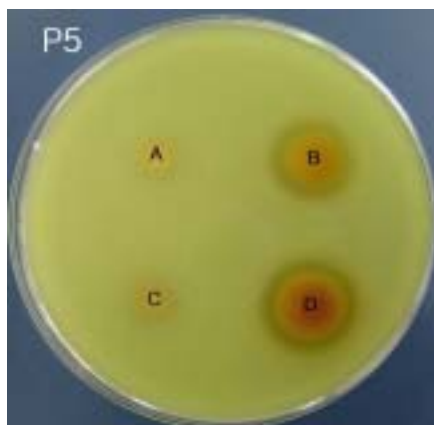


P16 : 전남 광주시
A : EEP 10mg B : WEEP 10mg
C : EEP 20mg D : WEEP 20mg

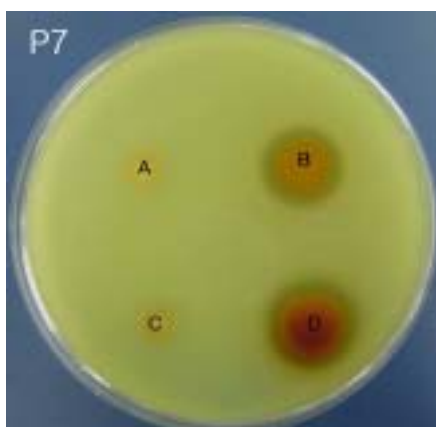
Figure 17. Comparison of inhibitory zone formation by Korea Propolis extract at *Salmonella* (CCARM 8009)



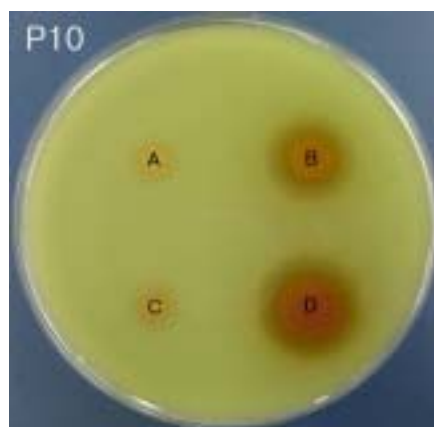
P1 : 강원도 춘천시 약사동
 A : EEP 10mg B : WEEP 10mg
 C : EEP 20mg D : WEEP 20mg



P5: 강원도 춘천시 서면
 A : EEP 10mg B : WEEP 10mg
 C : EEP 20mg D : WEEP 20mg



P7 : 충북 괴산군 장연면
 A : EEP 10mg B : WEEP 10mg
 C : EEP 20mg D : WEEP 20mg



P10 : 충북 충주시
 A : EEP 10mg B : WEEP 10mg
 C : EEP 20mg D : WEEP 20mg

Figure 18. Comparison of inhibitory zone formation by Korea Propolis extract at *Escherichia coli* (CCARM 15479)

4. 결론

위탁연구기관인 한국양봉농업협동조합의 협조로 국내 프로폴리스를 생산지별로 18종 채집하여 총 플라보노이드, 유효성분 정량분석, 항균성 등을 조사하였다. 프로폴리스는 생산지에 따라 색과 총 플라보노이드, 유효성분 등이 다 다르게 나타났으나 공통적으로 Caffeic acid, Cinnamic acid, Chrysin, Flavone 등의 유효성분들, 탄수화물, 단백질, 지방 등의 영양성분, 미네랄 성분도 다량 함유하고 있다.

또한 생산지별로 차이는 있지만 전반적으로 *Bacillus subtilis* (KCTC 1022)에 대한 항균 활성이 가장 높고, *Salmonella typhimurium* (KCTC 2515), *Candida albicans* (KCTC 7965)에도 높은 활성을 나타내었고, 항생제 내성을 갖는 황색포도상구균인 *Staphylococcus aureus* (CCARM 201)와 녹농균 *Pseudomonas aeruginosa* (CCARM 225)에도 높은 활성을 나타냈다.

이처럼 국산 프로폴리스는 다량의 유효성분들을 함유하고 높은 항균활성을 나타내는 등 우수한 원료로 생각되지만, 기준치 이상의 납이 검출되고 미량의 잔류 농약과 항생물질이 검출되는 시료가 있어 안정성에 대한 주의가 필요하다.

제 2 절 국내산 프로폴리스의 생산지별 항산화 효능 평가

1. 개요

프로폴리스는 항산화, 항균, 항염증 효과 등 다양한 생리적 활성이 밝혀지면서 국내외적으로 그 관심이 증가하고 있지만, 현재 국내산 프로폴리스의 항산화 및 다양한 활성에 대한 연구가 미비하며, 또한 국내산 프로폴리스의 생산지에 따른 활성 차이 또한 밝혀진 바 없다.

따라서 본 연구에서는 국내산 프로폴리스의 항산화 활성의 생산지에 따

른 차이를 규명하고, 항산화 활성이 우수한 국내산 프로폴리스를 선별하여 국외산과의 항산화 활성을 비교하였다.

프로폴리스 시작품 제조를 위한 국내산 프로폴리스를 최종 선발하였다.

2. 연구방법

가. *In vitro* 항산화 효능 평가

1) DPPH radical 소거 활성 측정

DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) radical 소거 활성법은 안정한 free radical화합물인 DPPH를 기질로 하여 시료의 항산화 활성을 측정하는 방법이다.

517nm에서 광흡수를 나타내는 보라색 화합물인 DPPH는 항산화물질에 의한 전자공여작용으로 탈색이 되기 때문에 517nm에서 흡광도 감소를 측정하여 항산화물질의 활성을 측정한다(1).

시료를 100% 메탄올에 녹이고 단계별로 희석하여 최종농도가 6.25, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 하였다. DPPH 라디칼 소거활성은 각기 다른 농도의 시료 0.01 ml에 0.15 mM DPPH 용액 0.99 ml 씩을 가하여 잘 혼합하여 30분 후 분광광도계 (UVIKON XS, SECOMAM, France)를 사용하여 517nm에서 흡광도를 측정하였다.

대조구는 시료대신 메탄올을 가해 흡광도 감소 정도를 조사하였으며, DPPH radical을 50% 소거시키는 시료의 농도를 IC_{50} 으로 표시하였다.

$$\text{EDA}(\text{Electron donating ability, \%}) = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

A_{control} : 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도

A_{sample} : 시료를 첨가한 반응구의 흡광도

2) Superoxide anion radical 소거 활성 측정

Superoxide radical (O_2^-)은 다른 유해 활성산소의 전구물질로 작용하므로 이 radical을 직접 소거할 수 있는 물질의 탐색은 항산화제 개발에 효과

적인 방법으로 많이 사용되고 있다.

본 실험에서는 xanthine/xanthine oxidase의 효소반응에 의한 superoxide 발생계와 WST-1이 환원되어 formazan이 생성되는 반응에 대한 시료의 억제 정도를 측정하였다(2).

시료를 메탄올에 용해시킨후 단계별로 희석하여 최종농도가 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 하였다. 96-well plate에 시료 7.5 μl , 1 mM EDTA가 포함된 50mM sodium phosphate buffer (PH 7.4) 75 μl , 0.5 mU xanthine oxidase, WST-8 solution 7.5 μl 를 첨가하여 1분간 RT에서 안정화시켰다. 2.5 mM xanthine 60 μl 를 첨가한 후 30분에 microplate reader (Molecular Devices, U.S.A)를 이용하여 450nm-650nm파장에서 흡광도를 측정하였다. superoxide anion radical 소거활성은 시료첨가구와 대조구의 흡광도 차이를 대조구의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

Superoxide anion radical scavenging activity(%) =

$$\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}} \times 100$$

A_{blank} : 시료와 Xanthine oxidase를 첨가하지 않은 blank의 흡광도

A_{control} : 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도

A_{sample} : 시료를 첨가한 반응구의 흡광도

3) 지질과산화억제 활성 측정

H_2O_2 는 Fenton reaction이나 metal-catalyzed Hear-Weiss reaction을 통해 더욱 반응성이 큰 hydroxyl radical을 발생시켜 지질과산화 반응을 유발하여 비가역적, 비선택적으로 거의 모든 세포 구성 성분들을 파괴시킨다. 지질과산화 반응 결과 생성되는 malondialdehyde (MDA)는 thiobarbituric acid(TBA)와 정량적으로 반응하여 분홍색을 나타내어 흡광도를 측정함으로써 정량분석 할 수 있다.

본 연구에서는 rat liver의 microsome을 이용하여 비효소적 방법인 Fe^{2+} /ascorbate 반응계를 이용하여 지질과산화 억제활성을 측정하였다.

Rat의 간으로부터 Hogeboom의 방법(3)에 따라 차등 원심분리법으로 microsome을 분리한 후, Na 등의 방법(4)에 따라 microsome의 지질과산화 결과로 생성된 malondialdehyde(MDA)를 thiobarbituric acid(TBA)와 반응시켜 분광학적 방법으로 정량하였다.

Phosphate 완충용액 (50 mM, pH 7.4) 740 μ l, 0.8 mM FeSO₄, 2 mM Ascorbic acid를 premix한 후 200 μ l 및 microsome (1 mg protein/ml) 50 μ l 넣고 메탄올에 녹인 시료 10 μ l를 넣은 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다.

반응액에 20% TCA 용액 250 μ l를 가하여 반응을 정지시키고 1% TBA 용액 250 μ l를 가하고 100°C에서 15분간 끓인 후 5,000 rpm으로 5분 동안 원심분리 하였다. 532nm에서 그 상등액의 흡광도를 측정하였다.

각 시료의 지질과산화 억제활성은 대조구에 대한 시료 첨가구의 MDA 생성 감소 정도로써 산출하였으며, 지질과산화 반응을 50% 억제시키는 농도를 IC₅₀로 하였다.

$$\text{지질과산화 억제활성 (\%)} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}} \times 100$$

A_{control} : 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도

A_{sample} : 시료를 첨가한 반응구의 흡광도

4) DNA 방어효과 검색

시료의 산화적 손상에 대한 DNA 방어효과를 알아보기 위하여 Yeung 등의 방법(5)에 따라 H₂O₂와 FeCl₂의 Fenton reaction에 의해 발생하는 hydroxyl radical (HO·)이 plasmid DNA에 손상을 가하는 정도를 전기영동에 의해 비교하였다.

Supercoiled DNA의 단일 나선 단절 검정은 전기영동 후에 분석하였다. pUC18 plasmid DNA를 0.5 μ g를 넣고 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4), 3% H₂O₂, 100 μ M FeCl₂를 각각 5 μ l씩 넣고 시료를 5 μ l(50 μ g/ml) 처리하여 37°C에서 30분 동안 반응시켰다.

반응용액을 5 μ l loading buffer와 혼합하여, 1% agarose gel을 사용하여 TAE buffer (40 mM Tris acetate, 2 mM EDTA)로 100V에서 30분간 전기영동 하였다.

전기영동 후 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ethidium bromide용액에서 20분 동안 염색한 후 다시 1 mM MgSO_4 에서 20분간 탈색하여 UV light하에서 supercoiled DNA band 와 open circular DNA band를 확인하였다.

나. *In vivo* 항산화 효능 평가

1) 실험동물 및 시료 투여

실험동물은 오리엔트바이오에서 분양받은 생후 5주령의 ICR계 암컷 마우스를 $22\pm 1^\circ\text{C}$ 의 실내온도와 12시간 주기의 조명이 유지되는 사육실에서 2주간 적응시킨 후 사용하였다.

실험동물용 펠렛사료 (삼양사료)와 물은 자유로이 섭취하도록 하였다. 실험군 마우스에 각각의 프로폴리스 시료를 1일 1회 4일간 경구투여(20 mg/kg B.W)한 후 정상대조군을 제외한 나머지 실험군에 10% CCl_4 (150 μl)를 복강 주사하여 산화적 손상을 야기시켰다.

그 후 마우스를 18시간 동안 절식시킨 후 희생시켜 혈액과 간 조직을 얻어 산화적 손상 정도를 측정하였다.

2) 혈장내의 malondialdehyde(MDA) 측정

혈장내의 지질과산화 정도를 측정하기 위하여 마우스의 혈액을 항응고제인 EDTA가 함유된 시험관에 500 μl 씩 채취하여 $10000 \times g$ 에서 5분간 원심분리하여 혈장을 분리한 후 혈장내의 MDA의 양을 Jentzsch 등의 방법(6)에 따라 다음과 같이 측정하였다.

혈장 200 μl , 5 mM BHT 25 μl , 0.2 M orthophosphoric acid 200 μl 를 혼합하여 10초간 잘 섞은 후 1.6% TBA 25 μl 를 첨가하여 100°C 에서 45분 동안 반응시키고 실온에서 냉각하였다.

냉각된 혼합액에 n-butanol 1 ml과 포화 NaCl 50 μl 를 첨가한 후 10000 rpm 에서 2분간 원심분리 하여 분리된 butanol층을 수거하여 분광흡도계(UVIKON XS, SECOMAM, France)를 이용하여 535nm에서 흡광도를 측정하였다. 1,1,3,3-Tetraethoxy propane을 standard로 이용하여 혈장내 MDA를 정량하였다.

3) 간 조직내의 malondialdehyde(MDA) 측정

간조직내의 MDA 측정은 Ohkawa 등의 방법(7)에 따라 측정하였다. 조직 내 지질 과산화물의 함량 측정을 위하여 마우스의 간을(약 0.1g) 적출하여 0.9% NaCl로 세척 후 9배부피의 1.15% KCl solution에 침지시켜 1분간 얼음 속에서 균질화 하였다.

균질액 100 μ l, 50 mM BHT 10 μ l, 8.1% SDS 100 μ l, 20% acetic acid(pH 2.5) 750 μ l, 0.8% TBA 750 μ l, 증류수 300 μ l를 가한 다음 100℃에서 30분 동안 반응시키고 실온에서 냉각하였다.

냉각된 혼합액에 15 : 1 n-butanol : pyridin 1.5 ml과 증류수 0.5 ml을 첨가하여 3,500 rpm에서 10분간 원심분리한 후 분리된 butanol층을 수거하여 분광흡도계(UVIKON XS, SECOMAM, France)를 이용하여 532nm에서 흡광도를 측정하였다. 1,1,3,3-Tetraethoxy propane을 standard로 사용하여 조직 단위 당 MDA의 양을 산출하였다.

4) 혈장내의 glutathione(GSH)의 농도 측정

혈장내의 GSH 함량은 Halliwell의 방법(8)에 따라 수행하였다. 마우스의 혈액을 채취하여 10000 \times g에서 5분간 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 분리한 혈장 200 μ l에 10% SSA(sulfosalicylic acid) 100 μ l를 가하여 단백질을 제거 하였다. 0.3 mM NADPH 700 μ l, 6 mM 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic Acid)(DTNB) 100 μ l와 H₂O 100 μ l을 25℃로 5분 유지시킨 후 단백질이 제거된 혈장 100 μ l과 25 unit/protein의 GR(Glutathione reductase) 10 μ l을 넣고 잘 흔들어 곧 바로 412nm에서 1분간 흡광도의 증가량을 측정하였다. 혈장내 GSH농도는 reduced glutathione을 standard로 사용하여 산출하였다.

3. 연구결과

가. 국내산 프로폴리스의 *in vitro* 항산화 활성 비교

국내 18 지역에서 생산된 프로폴리스의 1차 *in vitro* 항산화 활성을 검정한 결과 생산지에 따른 다양한 활성의 차이를 확인할 수 있었다. DPPH radical 소거활성 시험에서는 P1, P12와 P13 시료가 높은 활성을 나타냄을

확인할 수 있었으며(Fig. 19), superoxide anion radical 소거활성 시험에서는 P9, P12, P13, P15과 P16 시료가 높은 활성을 나타내 DPPH radical 소거활성 시험과 유사한 결과를 나타내었다(Fig. 20). 반면 lipid peroxidation 억제활성 시험에서는 P1, P5, P7과 P9~P16 시료 등 다양한 생산지의 시료가 높은 활성을 보였다(Fig. 21). 이 세 가지 시험에서 모두 높은 활성을 나타낸 P12와 P13 지역 프로폴리스 시료를 고효능 시료로서 선별하였다(Table 22).

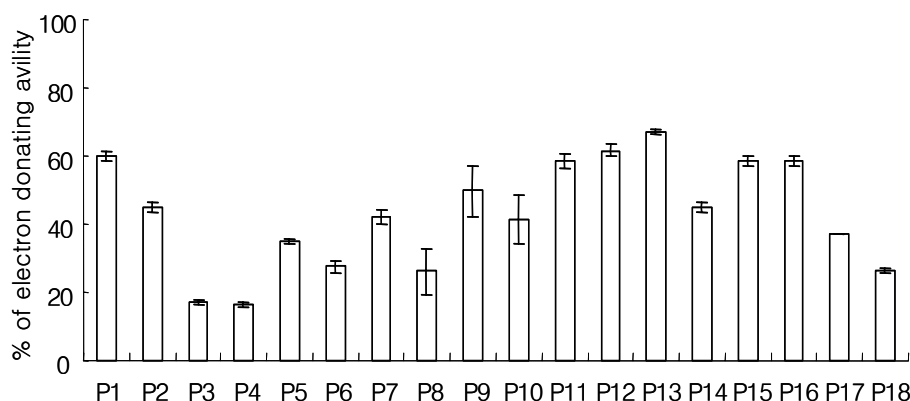


Figure 19. DPPH radical scavenging activity of Korean propolis samples. DPPH radical scavenging activity was measured spectrophotometrically by monitoring decrease in absorbance at 517nm. Concentration of each propolis was 20 ug/ml. Each experiment was performed at least 3 times and data are expressed as average percent change from control.

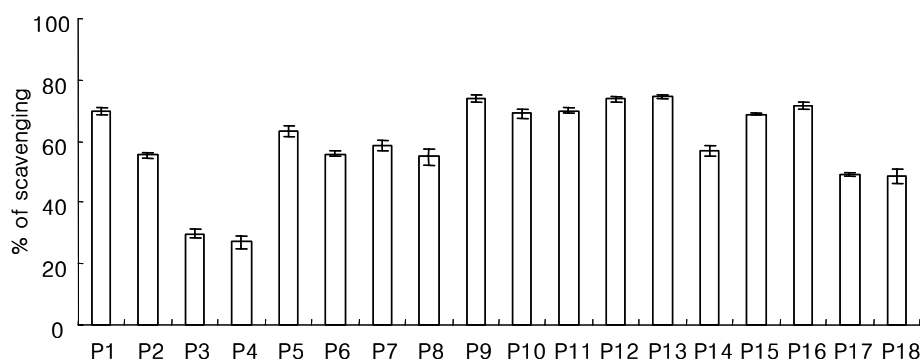


Figure 20. Superoxide anion radical scavenging activity of Korean propolis samples. Superoxide anion radical scavenging activity was measured spectrophotometrically by monitoring decrease in absorbance at 450nm-650nm. The concentration of each propolis was 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Each experiment was performed at least 3 times and data are expressed as average percent change from control.

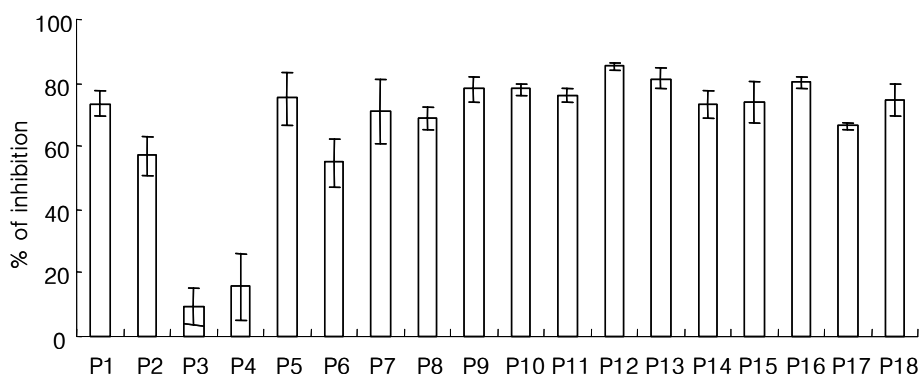


Figure 21. Lipid peroxidation inhibitory activity of Korean propolis samples. Lipid peroxidation inhibition activity was measured spectrophotometrically by monitoring decrease in absorbance at 532nm. The concentration of each propolis was 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Each experiment was performed at least 3 times and data are expressed as average percent change from control.

Table 22. Summary of antioxidant effects of 18 Korean propolis samples on DPPH radical, superoxide anion radical and lipid peroxidation.

Sample name	Antioxidant assays		
	DPPH radical scavenging activity ^{a)}	Superoxide anion radical scavenging activity ^{a)}	Lipid peroxidation inhibitory activity ^{a)}
P1	+++	+++	++++
P2	+	++	++
P3	–	+	–
P4	–	+	–
P5	+	+++	++++
P6	+	++	++
P7	+	++	++++
P8	+	++	+++
P9	+	++++	++++
P10	+	+++	++++
P11	++	++++	++++
P12	+++	++++	++++
P13	+++	++++	++++
P14	+	++	++++
P15	++	+++	++++
P16	++	++++	++++
P17	+	+	+++
P18	+	+	++++

^{a)} –:10%<activity<20%, +:20%<activity<50%, ++:50%<activity<60%, +++:60%<activity<70%, ++++:activity>70%.

나. 선별된 국내산 프로폴리스와 국외산 프로폴리스의 항산화 활성 비교

생산지별 국내산 프로폴리스의 *in vitro* 항산화 효과 시험 결과를 바탕으로 선별된 고효능 국내산 프로폴리스 시료 2종(P12, P13)과 브라질(BP) 및 중국산(CP) 프로폴리스 시료에 대하여 *in vitro* 항산화 활성과 마우스를 이용한 *in vivo* 항산화 활성을 비교하였다.

1) *In vitro* 항산화 활성 비교

본 실험에서는 국내산 프로폴리스와 국외산 프로폴리스 시료 4종에 대하여 DPPH 라디칼과 superoxide anion 라디칼에 대한 소거 활성, 지질과산화 억제 활성, DNA 손상 억제 활성 등 *in vitro* 항산화 활성을 측정하여 각 시료간의 활성을 비교 검토하였다.

가) DPPH 라디칼 소거 활성

먼저 각 프로폴리스 시료의 DPPH radical 소거활성을 검증한 결과 100 $\mu\text{g/ml}$ 과 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 고농도에서는 시료 간 활성의 차이가 약하게 나타났으나, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 과 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 의 저농도에서 시료 간 활성에 차이가 있었다.

그 결과 P12의 IC_{50} 값이 7.8 $\mu\text{g/ml}$ 로 가장 낮게 나타났으며, BP에서 19.1 $\mu\text{g/ml}$ 로 그 활성이 가장 저조하게 나타났다. 각각의 IC_{50} 값을 비교해보면 국내산 프로폴리스가 국외산보다 높은 DPPH radical 소거활성을 나타냈다(Table 23).

Table 23. DPPH radical scavenging activity of propolis samples: P12, P13, BP and CP.

	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Sample			
		P12 ^{c)}	P13 ^{d)}	BP ^{e)}	CP ^{f)}
EDA ^{a)} (%)	6.25	45.1 \pm 1.0 ^{g)}	44.0 \pm 3.1	27.0 \pm 1.7	29.4 \pm 0.1
	12.5	64.8 \pm 1.5	64.5 \pm 0.5	40.3 \pm 1.2	44.3 \pm 2.3
	25	89.7 \pm 0.1	89.6 \pm 0.1	57.5 \pm 2.0	63.8 \pm 1.4
	50	89.6 \pm 0.0	88.9 \pm 2.0	82.2 \pm 0.2	87.6 \pm 0.6
	100	89.7 \pm 0.2	88.9 \pm 0.2	91.7 \pm 0.1	89.2 \pm 0.1
IC ₅₀ ^{b)} ($\mu\text{g/ml}$)		7.8	8.1	19.1	16.2

^{a)}EDA : Electron Donating Ability.

^{b)}IC₅₀ represents the concentration at which each sample shows 50% EDA.

^{c)}P12 : Gangwon-do, Samcheok, ^{d)}P13 : Gyeongsangbuk-do, Andong

^{e)}BP : Brazil, Amazon, ^{f)}CP : China, Hainantao

^{g)}Each value represents the mean \pm SD of three replicates.

나) Superoxide anion 라디칼 소거 활성

프로폴리스 시료별로 xanthine과 xanthine oxidase에 의해 발생하는 superoxide anion radical을 소거하는 능력을 평가한 결과, 200 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서 프로폴리스 시료간의 활성 차이가 나타났다. P12는 IC₅₀ 값이 35.25 $\mu\text{g/ml}$ 로 가장 높은 활성을 나타내었다. 그리고 국내산이 국외산에 비해 전체 농도에서 높은 활성을 나타내었으며, 특히 BP는 IC₅₀ 값이 63.8 $\mu\text{g/ml}$ 로 활성이 가장 저조하게 나타났다(Table 24).

Table 24. Scavenging activity of propolis samples, P12, P13, BP and CP, on superoxide anion radical generated in xanthine-xanthine oxidase system.

	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Sample			
		P12 ^{b)}	P13 ^{c)}	BP ^{d)}	CP ^{e)}
Scavenging (%)	12.5	20.2 \pm 0.4	18.4 \pm 1.8	11.5 \pm 0.7	17.9 \pm 1.8
	25	37.9 \pm 0.8	34.4 \pm 2.4	24.5 \pm 1.8	29.3 \pm 2.7
	50	61.7 \pm 0.3	59.9 \pm 3.8	46.1 \pm 0.9	50.1 \pm 1.8
	100	81.2 \pm 1.8	79.6 \pm 2.2	60.3 \pm 1.4	60.8 \pm 1.8
	200	90.2 \pm 0.3	89.4 \pm 0.3	75.6 \pm 0.7	73.4 \pm 1.1
IC ₅₀ ^{a)} ($\mu\text{g/ml}$)		35.2	38.4	63.8	47.8

^{a)}IC₅₀ represents the concentration at which each sample shows 50% scavenging.

^{b)}P12 : Gangwon-do, Samcheok, ^{c)}P13 : Gyeongsangbuk-do, Andong

^{d)}BP : Brazil, Amazon, ^{e)}CP : China, Hainantao

Each value represents the mean \pm SD of three replicates.

다) *In vitro* lipid peroxidation 억제 활성

흰쥐의 간 분획물인 microsome을 지질원으로 사용하여 *in vitro* lipid peroxidation 억제효과를 평가한 결과, 10 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서 지역별 활성의 차이를 확인할 수 있었다. P12, P13과 CP에서는 IC₅₀값이 각각 3.3, 3.1, 3.0 $\mu\text{g/ml}$ 으로 유사하게 나타났으나, BP에서는 4.1 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타나 그 활성이 약간 낮은 것으로 나타났다(Table 25).

Table 25. Lipid peroxidation inhibitory activity of propolis samples: P12, P13, BP and CP.

	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Sample			
		P12 ^{b)}	P13 ^{c)}	BP ^{d)}	CP ^{e)}
Inhibition (%)	1.25	15.1 \pm 2.6	11.2 \pm 4.6	5.5 \pm 2.5	6.9 \pm 1.0
	2.5	37.8 \pm 4.2	41.4 \pm 3.2	28.4 \pm 4.5	41.9 \pm 7.2
	5	76.9 \pm 4.2	79.5 \pm 5.8	62.1 \pm 2.7	79.5 \pm 3.2
	10	91.1 \pm 2.1	89.9 \pm 3.6	82.9 \pm 2.7	87.9 \pm 5.0
	20	93.6 \pm 0.4	93.7 \pm 1.0	93.3 \pm 1.5	92.4 \pm 2.3
IC ₅₀ ^{a)} ($\mu\text{g/ml}$)		3.3	3.1	4.1	3.0

^{a)}IC₅₀ represents the concentration at which each sample shows 50% inhibition.

^{b)}P12 : Gangwon-do, Samcheok, ^{c)}P13 : Gyeongsangbuk-do, Andong

^{d)}BP : Brazil, Amazon, ^{e)}CP : China, Hainantao

Each value represents the mean \pm SD of three replicates.

라) *In vitro* 산화적 DNA 손상에 대한 방어효과

각 지역의 프로폴리스가 Fenton 반응으로 발생하는 hydroxyl radical (HO·)에 의한 pUC18 plasmid DNA의 산화적 손상을 억제하는 효과를 관찰 하였다. 산화적 손상을 야기하지 않은 1번 lane에서는 supercoil 형태가 뚜렷이 나타났으나 산화적 손상을 야기한 2번 lane에서는 supercoil이 절단되어 뚜렷한 open circular 형태를 나타내었다. P12, P13과 CP를 처리한 경우에는 DNA damage가 억제되어 supercoil 형태를 유지할 수 있었지만, BP의 경우에는 DNA damage 방어 효과가 저조하여 open circular 형태가 더 뚜렷이 나타나고 있다(Figure 22).

H ₂ O ₂ (0.6%)	0	5	0	5	5	5
FeCl ₂ (20uM)	0	5	5	5	5	5
sample(10 µg/ml)	-	-	P12	P13	BP	CP

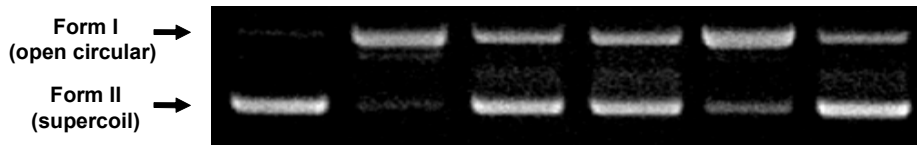


Figure 22. Protective effects of propolis samples against hydroxyl radical-induced damage of pUC18 plasmid DNA. 0.5 µg of pUC18 plasmid was incubated in the presence or absence of propolis samples(10 µg/ml). Hydroxyl radical generation was initiated by addition of H₂O₂ and FeCl₂. The supercoiled and opencircular plasmid was separated and visualized as described in Material & Methods

P12 : Gangwon-do, Samcheok, P13 : Gyeongsangbuk-do, Andong, BP : Brazil, Amazon, CP : China, Hainanttao

2) *In vivo* 항산화 활성 비교

본 실험에서는 마우스에 사염화탄소(CCl₄)를 복강 주사하여 산화적 스트레스를 유발시킨 동물모델에서 국내산 프로폴리스 2종과 국외산 프로폴리스 시료 2종의 경구섭취 시 생체 내 항산화 활성을 비교하였다. 항산화 시험 지표로는 간 조직 내의 MDA 함량, 혈장내의 MDA 및 glutathione 함량을 측정하였다.

가) 간 조직내의 malondialdehyde(MDA) 감소 효과

각 프로폴리스 시료를 경구투여한 후 CCl₄를 복강주사 하여 지질과산화를 야기시킨 마우스의 간 분획에서 MDA 함량을 측정하였다. CCl₄를 투여하지 않은 정상대조군에서 MDA함량은 1 mg protein 당 0.8 nmol이었으며, CCl₄를 투여하여 지질과산화를 야기한 그룹에서는 1.7 nmol로 2배 이상 MDA 함량이 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 23). 프로폴리스 시료를

투여한 그룹에서 전체적인 MDA 함량의 감소가 관찰되었다. 그 중 P12와 P13 투여그룹에서 각각 1.08 nmol, 1.09 nmol로 70%의 감소효과를 보인데 반해($p<0.005$) 국외산인 BP와 CP 투여그룹은 각각 1.28 nmol(48%), 1.38 nmol(37%)로 낮은 감소율을 나타내었다.

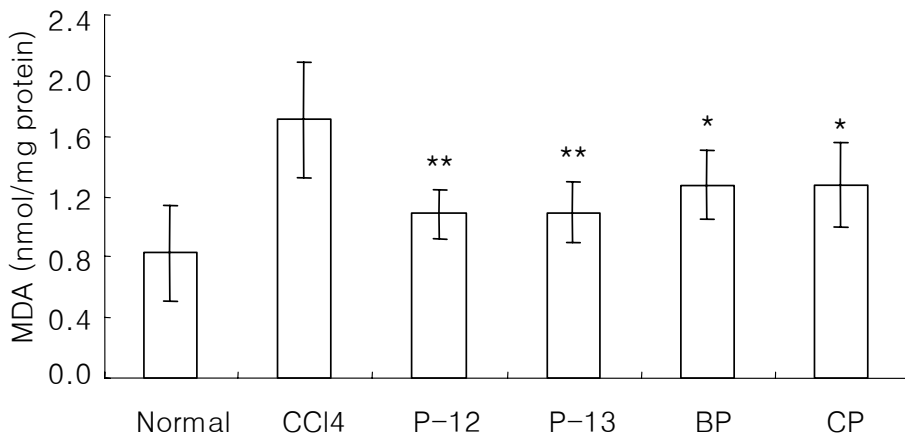


Figure 23. Reduction of liver MDA contents by propolis samples in the CCl₄-treated mice. Mice were administrated with propolis samples(20 mg/kg B.W) or vehicle for 4 days and followed by CCl₄ injection. After 18 hours, the liver was collected and the liver MDA contents was measured by TBA reaction. All values represent the mean±SD of eight mouse. (** $p<0.005$, * $p<0.05$)

나) 혈장내의 MDA 감소 효과

각 프로폴리스 시료를 경구투여한 후 CCl₄를 복강 주사하여 지질과산화를 야기한 마우스에서 혈장내의 MDA 함량을 측정하였다.

CCl₄를 투여하지 않은 정상대조군에서 MDA함량은 1 mg protein 당 3.1 nmol이었으며 CCl₄를 투여하여 지질과산화를 야기한 그룹에서는 8.0 nmol로 2.5배 이상 MDA 함량이 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 24).

CCl₄ 투여전에 프로폴리스를 투여한 그룹에서는 CCl₄만 투여한 그룹에 비해 MDA 함량이 줄어드는 것을 확인하였다.

그 중 P12 투여그룹에서 4.8 nmol로 65%의 높은 MDA감소율을 나타내고

있었으며($p<0.005$) 국외산인 BP 투여그룹에서는 7.1 nmol로 18%의 낮은 감소율을 나타내고 있었다.

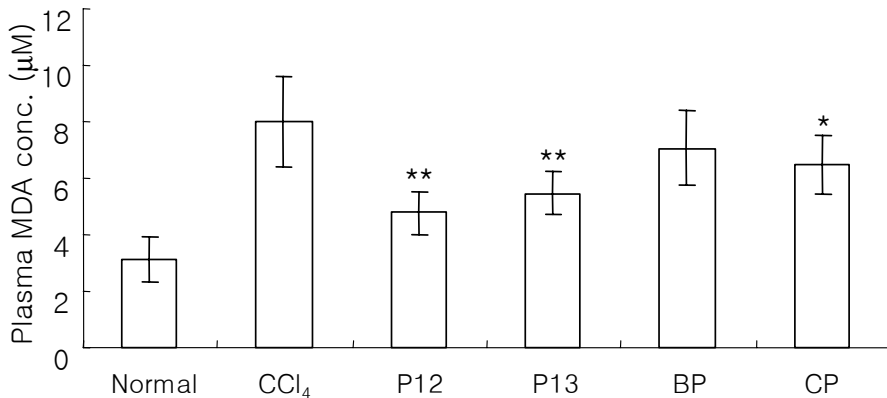


Figure 24. Reduction of plasma MDA contents by propolis samples in the CCl₄-treated mice. Mice were administrated with propolis samples(20 mg/kg B.W) or vehicle for 4 days and followed by CCl₄ injection. After 4 hours, the blood was collected and the plasma MDA contents were measured by TBA reaction. All values represent the mean±SD of eight mouse. (** $p<0.005$, * $p<0.05$)

다) 혈장내의 glutathione(GSH)의 농도 증가효과

각 프로폴리스 시료를 경구투여한 후 CCl₄를 복강주사 하여 산화적 손상을 야기한 마우스의 혈장내의 GSH 함량을 측정하였다.

정상대조군에서 GSH 함량이 14.08 μM이었으며, CCl₄를 투여하여 산화적 손상을 야기한 그룹에서는 5.6 μM로 60%이상 감소하는 것으로 나타났다($p<0.005$). CCl₄ 투여 전에 프로폴리스 시료를 투여한 그룹 중에서 국외산인 BP를 제외한 나머지 그룹에서 CCl₄만을 투여한 그룹에 비해 GSH 함량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 25).

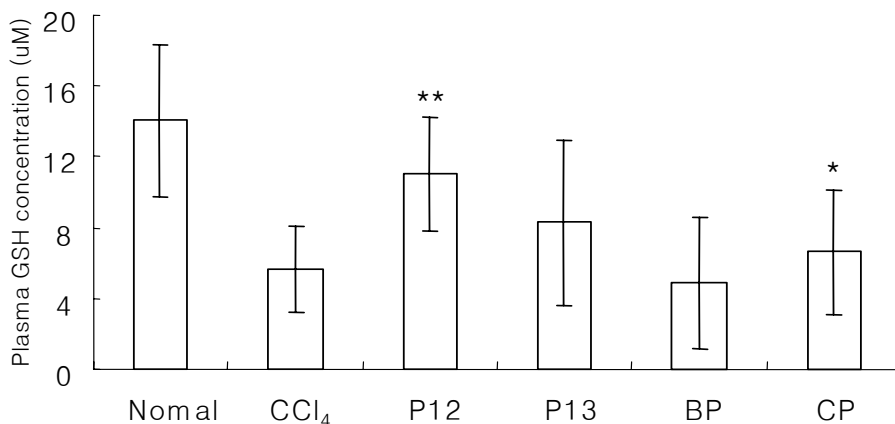


Figure 25. Recovery of plasma GSH contents by propolis samples in the CCl₄-treated mice. Mice were administrated with propolis samples(20 mg/kg B.W) or vehicle for 4 days and followed by CCl₄ injection. After 18 hours, the blood was collected and the plasma GSH contents the were measured by DTNB reaction.

All values represent the means±SD of eight mouse. (** $p < 0.005$, * $p < 0.05$).

4. 결론

본 연구에서는 국내에서 생산되는 프로폴리스의 생산지에 따른 항산화 활성을 평가하고 그 차이를 규명하고자 *in vitro* 항산화실험을 수행하였으며, 국내산 중 우수시료를 선발하여 국외산과 항산화 활성을 비교 검증함으로써 국내산 프로폴리스의 우수성을 알아보았으며, 이를 바탕으로 시제품 개발을 위한 국내산 프로폴리스를 최종 선발하였다.

국내에서 채집된 18 지역의 프로폴리스의 *in vitro* 항산화활성 시험을 수행한 결과 DPPH radical 소거활성, superoxide anion radical 소거활성, 그리고 lipid peroxidation 억제효과 실험 모두에서 P3과 P4 지역의 프로폴리스에서 그 활성이 현저히 낮은 것으로 나타났으며, P12와 P13지역의 프로폴리스에서 높은 활성을 나타내었다.

본 연구결과를 토대로 *in vitro* 항산화활성이 높은 국내산 프로폴리스로 P12와 P13 프로폴리스를 선발하였다.

현재 프로폴리스를 가장 활발히 생산하고 있는 국가인 브라질(BP)과 중국(CP)에서 생산된 프로폴리스를 대조군으로 국내에서 선별된 프로폴리스와 비교 실험을 수행하였다.

In vitro 항산화 실험에서 국내산인 P12와 P13이 BP에 비해 월등히 높은 항산화활성을 나타내는 것으로 확인되었다.

사염화탄소(CCl₄)에 의한 산화적 손상을 유발한 마우스 모델에서도 국내산 P12와 P13이 외국산 BP, CP에 비해 활성이 뛰어난 것으로 나타났다. 국내산 P12와 P13의 활성은 큰 차이를 나타내지 않았으나, P12의 활성이 대체적으로 약간 높은 것으로 나타났다.

이러한 결과를 바탕으로 국내 16개 지역에서 채집한 프로폴리스 중 가장 항산화 활성이 뛰어난 것으로 나타난 P12(강원도 삼척산)를 시작품 제조용 원료로 최종 선발하였다.

제 3절 프로폴리스의 유효성분 추출을 증대 및 무알콜·수용화 공법 개발

1. 개요

프로폴리스(Propolis)는 꿀벌이 식물로부터 수지(resin)를 수집하여 자신이 분비한 타액과 왁스를 혼합하여 만든 물질로서 식물성 수지, 왁스, 정유, 화분, 플라보노이드 및 기타 유기물과 미네랄 등으로 구성되어 있다.

프로폴리스의 주요한 작용은 항균·항염증 작용, 진통·마취작용, 면역작용, 항산화작용, 항바이러스작용, 항암작용, 항HIV·항AIDS 작용 등 생체 면역기능 활성화 작용과 같은 다양한 생리활성 기능가지고 있으며, 이는 함유된 식물 유래의 페놀성 화합물인 플라보노이드에 기인한다고 보고되고 있다.

동의보감 탕액편(湯液篇)에는 프로폴리스가 '노봉방(露蜂房. 말벌집)'이라는 이름으로 기록되어 경간(驚癰: 경기와 간질), 웅종(擁腫: 동창과 종기), 유옹(乳癰: 유방종기, 유방암) 치통 등에 효과가 있음을 설명하고 있으며,

현대에 와서는 감기, 알레르기, 아토피, 천식, 헤르페스, 창상, 피부미용, 노화억제 등과 각종 면역성 질환의 민간약으로 많이 사용되고 있다.

최근에는 질병예방 및 건강증진 대한 관심과 건강기능식품법령에 프로폴리스가 공시 원료로 공포(2004년 1월 31일)되면서 수요는 더욱 증가될 것으로 예상된다.

상기와 같이 프로폴리스의 인체 유익성에 따른 수요 증가가 예상되지만, 프로폴리스의 추출방법과 제조 후 사용상의 불편함 및 불수용성으로 인해 다양한 용도로 사용하는데 많은 문제점이 제시되고 있다.

종래의 프로폴리스 추출방법은 알코올(주정)과 물, 글리세린 등을 이용하는 것으로, 물에 잘 녹지 않고 물에 녹았다 할지라도 지방성분의 유화제를 사용하여 흡수율이 낮고 소화 장애가 일어나 대중성이 거의 없다.

즉, 종래에 있어서 주정으로 추출한 프로폴리스는 소화성 및 흡수율이 낮으며 물에 잘 녹지 않고 끈적임이 심하고 일단 피부에 묻게 되면 지워지지 않으며 맛이 거북하고 향이 강하여 일반인이 쉽게 섭취할 수 없었다.

또한 물로 추출한 것은 프로폴리스의 유효성분인 플라보노이드 함량이 대략 0.2% 정도로 낮아서 프로폴리스 본래의 기능인 항균작용 및 항산화작용이 거의 발휘되지 않고 있다.

프로폴리스 수용화 기술 개발은 국내·외에서 여러 방법으로 진행되고 있다. 대한민국 특허공개공보 제 1999-75441호에서는 프로폴리스 원피를 95% 에탄올로 추출하고 감압 농축한 후 원료 중량의 5-10배의 물을 가하고 전체 중량의 10-20%의 유화제를 첨가하여 균질이 되도록 혼합한 후 감압 농축하여 수용성 겔 상태의 프로폴리스를 제조하는 방법이 기재되어 있다. 대한민국 특허공개공보 제 2002-76979호에는 프로폴리스 원피를 95% 에탄올로 추출하고 65-70%의 용액이 되도록 물을 가한 후 구연산나트륨으로 pH가 6-7이 되도록 혼합하여 왁스를 제거하고 감압농축 후 프로필렌글리콜로 수용성 프로폴리스를 제조하는 방법이 기재되어 있다.

일본특허공개공보 제 2001-275587호에는 저온에서 원적외선을 이용하여 프로폴리스 원액을 추출 및 제조하는 방법이 기재되어 있다.

그러나 상기 대한민국 특허공개공보 제 1999-75441호는 제조공정의 간결성은 인정되나 10-20%의 지방성분의 유화제(폴리솔베이트, 모노글리세린아세테이트, 레시틴)의 사용으로 흡수율 저하와 소화 장애의 문제점이

있으며, 대한민국 특허공개공보 제 2002-76979호는 실시 예 A-1에서 프로폴리스의 수용화 용제로서 프로필렌글리콜을 사용하였는데 이는 장기보관 시 지방성분의 불안정에 따른 층 분리로 물성의 변화를 유발시키며, 실시 예 A-2에서 지방성분의 안정화를 고려하여 첨가한 유화제 (글리세린)는 프로폴리스 추출물의 활성효과와 인체의 흡수율을 저해하기 때문에 대중성이 고려되지 않은 방법이다. 아울러 이러한 단점들을 보완하기 위해 첨가한 활성화제 및 비감미료제의 사용은 다소 비경제적인 것으로 판단된다.

또한, 일본특허공개공보 제 2001-275587호는 단시간에 프로폴리스 원액을 추출할 수 있는 경제적인 추출 방법이지만 비수용성의 프로폴리스 원액이어서 복용 시 흡수율의 저하가 예상된다.

따라서 이러한 문제점을 개선하기 위하여 무알콜·수용성 공법을 개발하였다. 수용성 프로폴리스는 추출율과 함유되어 있는 플라보노이드의 함량이 증가하고 지질 과산화 억제효과가 있음을 확인하고 기술을 완성하였다. 본 추출 제조기술은 프로폴리스의 추출율 및 유효성분인 플라보노이드의 함량이 개선되었을 뿐 아니라, 프로폴리스 추출물 고유의 점착성에 따른 사용상의 불편함이 해소되고 음용이 용이하며 물에서 완전히 용해되어 침전물이 생기지 않는 물성을 가짐으로써 건강기능식품 및 가공식품의 원료로서 용이하게 사용할 수 있다.

2. 연구 방법

가. 프로폴리스의 유효성분 최적 추출의 조건 확립

1) 추출 용매

Propolis 분말 15g에 물과 50~95% 농도의 에탄올을 300ml 가하여 실온에서 24시간 동안 연속 교반 추출하였다.

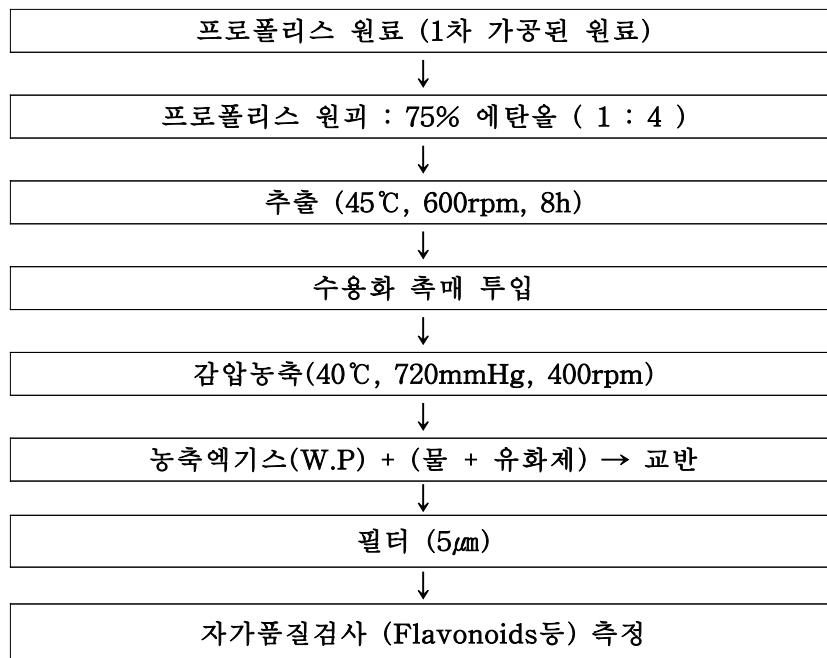
2) 추출 온도

최적 농도의 용매를 가하여 실온~80℃에서 24시간 동안 연속 교반 추출하였다.

3) 추출 시간

최적 용매로 최적 온도에서 12시간 동안 추출하면서 추출액을 취한 후 flavonoid 함량을 측정하여 최적 추출 시간을 결정하였다.

나. 무알콜·수용화(WWEP공법) 공정 개발



다. 무알콜·수용화 공법에 의한 시작품 제작

1) 시작품 생산(WEEP, 일진제약)

먼저 프로폴리스 추출물을 제조하기 위해 75% 농도로 조제된 주정, 프로폴리스를 추출기에 넣고 600rpm, 40℃으로 3일간 추출한 후 마이크로 필터를 이용하여 10μm로 여과한 후 스테인레스 저장 용기에 2일간 정치시킨다.

이 혼합액에 발효주정(50%)에 용해시킨 글리세린을 소량씩 첨가하며 다시 추출기에 이송하여 40℃, 600rpm, 700-740mmHg의 진공도로 농축한다.

프로폴리스추출액을 농축해가며 증발된 양만큼 글리세린용해액을 서서히 투

입한다. 잔류 에탄올이 0.1% 이하가 될 때까지 60℃, 800rpm, 680-720mmHg의 진공도로 농축하며, 농축이 되면 정제수에 용해한 글리세린을 1000rpm, 760mmHg의 진공을 가하여 12시간 교반 혼합하여 무알콜상태로 만든다. 용해된 혼합물을 스테인리스 저장용기에서 2일간 정치시킨 후 마이크로 필터를 이용하여 5 μ m로 여과하여 건강기능식품공전 시험법에 의거 자가 규격 시험을 거쳤다. 이처럼 에탄올로 추출한 후 다시 무알콜·수용성 상태로 만드는 공법을 WEEP 공법 (Water Ethanol Extract Propolis)라고 명명하였다.

이러한 WEEP공법을 이용하여, 대용량으로 국산 프로폴리스(P12, 강원 삼척)의 무알콜·수용화 원료를 생산하였다.

2) 시작품 평가(식품공전 의거)

국산 프로폴리스를 생산된 시작품을 평가하기 위하여 총 플라보노이드를 비롯한 유효성분 등을 확인하였다. 더불어 무알콜 수용성·프로폴리스를 물에 용해하였을 때, Particle size analyzer (Brookhaven Instruments corporation)를 이용하여 용해된 프로폴리스의 particle size를 측정하고 수용성 상태의 zeta potential 값을 측정하여 입자들의 분산도를 확인하였다.

3) 임상실험용 시작품 생산

임상실험을 진행하기 위해 피시험자에게 동일한 양의 프로폴리스를 제공하여야하고, 섭취하기에도 편리하여야 함으로 다양한 제형 중 캡슐형태로 제작하였다. 국산 프로폴리스(P12)로 만든 무알콜 수용성 프로폴리스를 이용하여 서흥캡셀(주)에 임상실험용 소프트 캡슐을 제작을 의뢰 하였다.

3. 연구 결과

가. 프로폴리스의 유효성분 추출을 증대

식품공전의 프로폴리스 식품의 제조 가공기준인 『추출 용매 물 또는 주정을 사용하여야 한다.』는 항목에 의거 프로폴리스로부터 프로폴리스 추출물을 제조함에 있어 추출 용매로 물과 에탄올을 사용하였다. 또한 프로폴리스에는 우리들의 건강유지에 중요한 작용을 하는 Flavonoid류, 비타민,

미네랄, 테르페노이드 등이 다량 함유되어 있어 강력한 항염증작용, 항균작용, 항산화 작용으로서 지질산화 방지활동, 지질과 산화 그룹 의 불순물을 제거하여 순화시키는 능력이 있다고 보고 되었다.

이러한 유효성분 중 flavonoid, 비타민A, D, E 등은 알코올에 잘 추출되며 미네랄, 다당류, 비타민B, C 등 은 물에 잘 추출된다. 그러므로 프로폴리스의 유효성분을 다량 추출하기 위해선 에탄올과 물을 함께 사용하여야 한다.

프로폴리스 추출물 제조를 위한 추출용매 선정 시험에서 물과 50-95% 에탄올을 사용한 결과 75% 에탄올이 가장 효율적인 것으로 나타났고, 추출 온도는 상온에서 80℃ 에서 시험해본 결과 수율 및 flavonoid 함량이 높은 40℃ 추출이 적합한 것으로 나타났다.

추출 시간 결정에서 2-12시간 동안 교반하면서 조사한 결과 8시간이 최적 추출시간인 것으로 나타났다.

나. 무알콜. 수용화 공법 개발

기존 추출방법은 에탄올 추출이 가장 좋은 방법(세계 70%)으로 알려져 있으나 실제로 식용으로 섭취하거나 타 용도로 활용 할 경우 에탄올 때문에 많은 제약을 받을 수밖에 없다.

이러한 이유로 많은 프로폴리스 회사들이 이 알코올이 없는 수용성 제품을 개발하려고 노력하고 있고 일본과 호주의 업체가 근접하고는 있으나 아직 완벽한 무알콜 수용성 제품은 성공하지 못하고 있는 실정이다.

일본은 미셀화 기술을 이용하여 무알콜로 하고 있으나 실체는 알코올이 20% 이상 함유된 상태로 완전 무알콜 상태로 생산하지는 못하고 있는 실정이다. 완전 무알콜이 아닌 경우 의약품, 화장품, 생활용품, 동물약품 등에)등에 적용시 안정성이 떨어져 상품화가 어렵다.

무알콜 수용성 프로폴리스의 제조방법에 관한 것으로, 상세하게는 프로폴리스 원피를 75%알코올에 침지한 후 추출하여 여기에 알칼리 및 유기산, 물을 첨가하고 알코올을 농축시켜 고수용성의 프로폴리스를 제조하는 것이다.

국내산 프로폴리스 18종 중 총 플라보노이드의 함량도 높고 항산화 활성 및 DNA 방어효과가 우수하고 *in vivo* 지질 과산화 시험에서도 높은 활

성을 보이는 P-12(강원 삼척)를 이용하여 무알콜 수용화 프로폴리스를 제작하는 공정법을 개발하였다.

다. 무알콜·수용화 공법에 의한 시작품 제작

1) 시작품 생산

선별된 프로폴리스(P12, 강원삼척)를 수매하여 위의 WEEP 공법을 이용하여 무알콜 수용성 프로폴리스를 제조하였다.



[에탄올 추출 프로폴리스] [무알콜·수용성 프로폴리스]

Figure 26. 에탄올 추출 프로폴리스와 무알콜·수용성 프로폴리스의 수용화 비교

2) 시작품 평가(식품공전 의거)

국산 프로폴리스(P12)를 이용하여 생산된 시작품을 평가하기 위하여 총 플라보노이드를 측정된 결과 1.4%이상의 높은 함량을 나타내었다. 더불어 무알콜 수용성 · 프로폴리스를 물에 용해하여 수용액 상태의 Particle size를 측정하였다. Fig. 27 에서 보여지 듯 프로폴리스의 콜로이드 입자 크기는 2375nm 이었다.

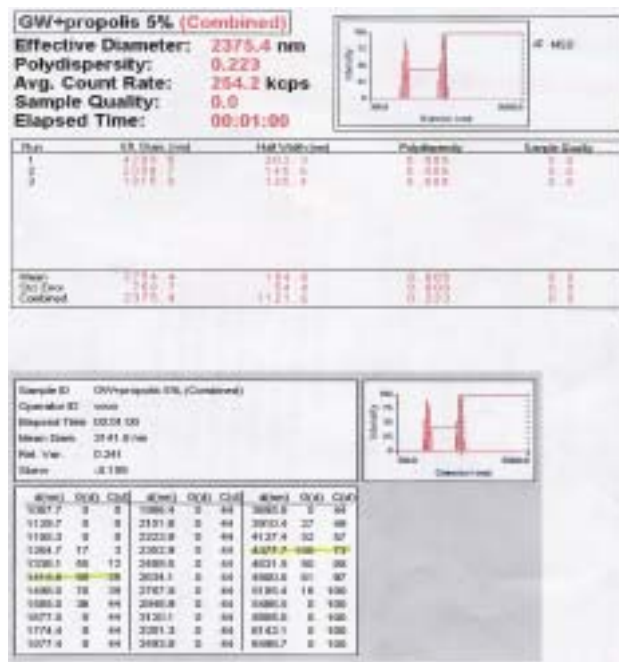


Figure 27. Particle size of propolis.

또한 프로폴리스 수용액 상태의 제타 퍼텐셜(Zeta potential)값을 측정하였다. 제타 퍼텐셜(Zeta potential)이란 액체 속에 부유하는 콜로이드 입자의 표면 전기적 특성인 '전위'이다. 이는 부유물질끼리 또는 부유물질과 필터 등의 표면에서의 전기적 흡인력과 반발력의 기준으로 사용되며, 일반적으로 Zeta potential의 크기 값은 mV이다. 여기서 콜로이드 상태란 물질이 분자 또는 이온상태로 액체 중에 고르게 분산해 있는 것을 용액이라고 하는데, 미립자가 기체 또는 액체 중에 응집하거나 침전하지 않고 분산된 상태를 뜻하며, 콜로이드 용액이 안정하게 존재하는 것은 콜로이드 입자가

같은 종류의 전기를 띠고 있어 서로 반발하고 있기 때문이다.

콜로이드 입자의 제타 퍼텐셜을 측정하기 위해 입자의 동전기 특성 (electro kinetic)을 이용하는데, 음전기를 띤 콜로이드 입자가 외부 전기장 하에서 양의 전극으로 움직일 때 주어진 전기장 하에서의 '입자속도'를 측정함으로써 그 입자가 띠고 있는 전기적 특성인 제타 퍼텐셜의 값을 측정할 수 있다.

Fig. 28 에서 나타난 것처럼 수용액 상태의 프로폴리스는 42-46정도의 안정적인 제타 퍼텐셜 값을 가지며 40이상의 절대값을 나타내므로 입자사이들이 서로 반발하여 응집현상이 없고 안정적인 수용화 상태를 유지할 것으로 보인다.

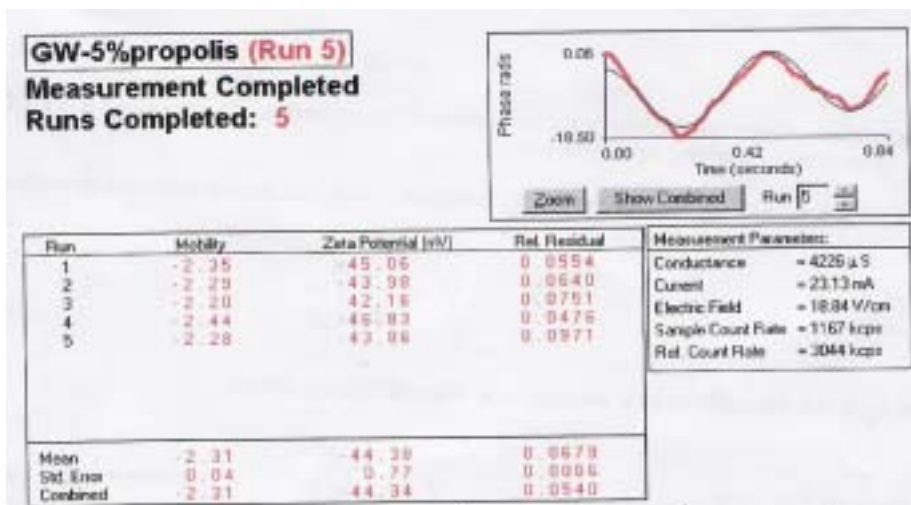


Figure 28. Zeta potential of propolis

3) 임상시험용 시약품 생산

임상시험을 진행하기 위해 피시험자에게 동일한 양의 프로폴리스를 제공하여야하고, 섭취하기에도 편리하여야 함으로 다양한 제형 중 캡슐형태로 제작하였다.

국산 프로폴리스(P12)로 만든 무알콜 수용성 프로폴리스를 이용하여 서홍캡셀(주)에 임상시험용 소프트 캡슐을 제작을 의뢰 하였다.

임상시험은 피험자 40명이 위약과 프로폴리스 군으로 20명씩 나뉘어 2

주간 복용해야 함으로 각 3,000개의 위약과 프로폴리스 캡슐을 만들었다.(Fig. 29) 연질의 갈색 캡슐(10 oval-1)로 위약과 프로폴리스 동일하게 만들었으며, 위약에는 프로폴리스대신 대두유를 첨가하였고 연질 캡슐의 배합 비는 Table 26 와 같다.

Table 26. 프로폴리스 소프트 캡슐 배합 비율

	프로폴리스		위약	
	비율(%)	양(mg)	비율(%)	양(mg)
프로폴리스 추출물	20.0	110	-	-
대두유	51.3	282.12	71.3	382.12
밀랍(황납)	8.7	47.85	8.7	47.85
야자경화유	20.0	110	20.0	110
계	100	550	100	550



Figure 29. 프로폴리스 소프트 캡슐

4. 결과

국산 프로폴리스의 추출물 제조를 위한 최적 조건은 추출용매는 75% 에탄올, 추출 온도는 40℃, 추출 시간은 8시간으로 나타났다.

이렇게 추출된 프로폴리스의 무알콜 수용화 제조방법은 75%에탄올에 침지한 후 추출, 여과하여 여기에 알칼리 및 유기산, 물을 첨가하고 에탄올을 농축시켜 고수용성의 프로폴리스를 제조하는 것이다.

본 실험에서는 활성이 가장 우수한 국산 프로폴리스 P12(강원 삼척)를 대량 구매하여 무알콜·수용성 프로폴리스를 생산하였고, 임상실험을 위한 시작품을 제작하였다.

무알콜·수용성 프로폴리스는 추출물 및 유효성분인 플라보노이드의 함량이 개선되었을 뿐 아니라, 프로폴리스 추출물 고유의 점착성에 따른 사용상의 불편함이 해소되고 음용이 용이하며 물에서 완전히 용해되어 침전물이 생기지 않는 물성을 가짐으로써 건강기능식품 및 가공식품의 원료로서 용이하게 사용할 수 있다.

제 4 절 프로폴리스 시작품의 동물모델에서 항산화 및 면역활성 보호 효과

1. 개요

본 연구에서는 국내산 프로폴리스 중에서 가장 항산화 활성이 뛰어난 P12 지역의 프로폴리스를 이용하여 제조한 무알콜·수용성 (WEEP)프로폴리스 시작품에 대하여 항산화 및 면역활성 보호효과를 검증하고자 하였다. 시작품의 항산화 활성은 사업화탄소를 이용하여 생체 내 산화적 손상을 유발한 마우스 모델에서 간조직 및 혈장내의 지질과산화물(MDA) 양의 경감효과를 관찰하였다.

시작품의 면역활성 보호효과는 방사선을 이용한 산화적 손상을 유발한 모델에서 면역세포 및 조혈세포의 생성이 이루어지는 골수내의 세포 DNA

손상에 의한 미소핵 발생억제 효과와, 조혈모세포의 생존율을 측정하는 지표인 비장집락형성에 대한 증가효과를 관찰하였다.

2. 연구방법

가. 사염화탄소 투여 마우스에서 지질과산화 억제 효과 측정

무알콜 . 수용성 (WEEP)프로폴리스 시작품의 지질과산화 억제 효과는 사염화탄소에 의해 유발된 간조직 및 혈장내의 지질과산화물(MDA)양을 측정하여 평가하였다.

생후 9주령의 암컷 ICR 마우스를 정상대조군, 사염화탄소투여군, 시작품 10mg/kg B.W. 경구투여군, 시작품 20 mg/kg B.W. 경구투여군으로 그룹당 8마리로 나누었다.

시작품 투여군에 시료를 1일 1회 4일간 경구투여(10 또는 20 mg/kg B.W.)한 후 정상대조군을 제외한 나머지 실험군에 10% CCl₄(0.5ml CCl₄/kg B.W.)를 복강 주사하여 산화적 손상을 야기했다. 그 후 마우스를 18시간 동안 절식시킨 후 희생시켜 혈액과 간 조직을 얻어 지질과산화 정도를 측정하였다.

혈장내의 지질과산화물인 MDA의 측정은 Jentzsch 등의 방법(6)에 따라 수행하였다. 마우스의 혈액을 항응고제인 EDTA가 함유된 시험관에 500 μ l씩 채취하여 10000 \times g에서 5분간 원심 분리하여 혈장을 분리하였다.

혈장 200 μ l, 5 mM BHT 25 μ l, 0.2 M orthophosphoric acid 200 μ l를 혼합하여 10초간 잘 섞은 후 1.6% TBA 25 μ l를 첨가하여 100℃에서 45분 동안 반응시키고 실온에서 냉각하였다.

냉각된 혼합액에 n-butanol 1 ml과 포화 NaCl 50 μ l를 첨가한 후 10000 rpm에서 2분간 원심분리 하여 분리된 butanol층을 수거하여 분광흡도계(UVIKON XS, SECOMAM, France)를 이용하여 535nm에서 흡광도를 측정하였다. 1,1,3,3-Tetraethoxy propane을 standard로 이용하여 혈장내 MDA를 정량하였다.

간조직 내 지질과산화물인 MDA의 함량 측정은 Ohkawa 등의 방법(7)에 따라 수행하였다. 마우스의 간을(약 0.1g) 적출하여 0.9% NaCl로 세척

후 9배부피의 1.15% KCl solution에 침지시켜 1분간 얼음 속에서 균질화하였다.

균질액 100 μ l, 50 mM BHT 10 μ l, 8.1% SDS 100 μ l, 20% acetic acid(pH 2.5) 750 μ l, 0.8% TBA 750 μ l, 증류수 300 μ l를 가한 다음 100℃에서 30분 동안 반응시키고 실온에서 냉각하였다.

냉각된 혼합액에 15 : 1 n-butanol : pyridin 1.5 ml과 증류수 0.5 ml을 첨가하여 3,500 rpm에서 10분간 원심분리한 후 분리된 butanol층을 수거하여 분광흡도계(UVIKON XS, SECOMAM, France)를 이용하여 532nm에서 흡광도를 측정하였다. 1,1,3,3-Tetraethoxy propane을 standard로 사용하여 조직 단위 당 MDA의 양을 산출하였다.

나. 방사선 조사 마우스에서 소핵 형성 측정

생후 9주령의 암컷 ICR 마우스를 각 그룹 당 5마리로 하여 대조군, 방사선조사 대조군, 시작품 25mg/kg B.W. 경구투여군, 시작품 50 mg/kg B.W. 경구투여군으로 나누었다.

시작품은 방사선 조사 전 36시간 및 12시간, 방사선 조사 후 30분에 경구투여(25 또는 50 mg/kg B.W.)하였으며, 방사선을 조사(3Gy)하고 24시간 후에 마우스를 희생시켜 골수세포를 수거하여 슬라이드에 도말, 건조한 한 후, Schmid등의 방법(9)에 따라 May-Grunwald/ Giemsa 염색하고 현미경으로 관찰하여, 정염성 적혈구와 다염성 적혈구의 비율을 구하고, 다염성 적혈구 중에서 소핵을 갖는 세포의 빈도를 구하였다.

다. 방사선 조사 마우스에서 비장집락형성 측정

방사선 조사에 대한 시작품의 면역 조혈계 보호효과를 알아보기 위하여 방사선조사 후 생존하는 조혈모세포의 수를 측정하는 비장집락형성 시험을 수행하였다.

약 40주령의 암컷 ICR 마우스를 방사선조사 대조군, 시작품 10 mg/kg B.W. 경구투여군, 시작품 20 mg/kg B.W. 경구 투여군으로 나누어 각 군당 12마리씩 배정하였다.

시작품 투여군에는 방사선조사 (6.5Gy) 7일전부터 조사 후 10일까지 시작품을 매일 1회 시작품을 경구 투여하였으며, 방사선 조사 10일 후 마우

스의 비장을 적출하여 Milas 등의 방법(10)에 따라 비장표면의 조혈세포 집락수를 계수하였다.

3. 연구결과

가. 사염화탄소 투여 마우스의 지질과산화 억제 효과

사염화탄소(CCl_4)는 간에서의 대사과정에서 다량의 자유라디칼을 발생시켜 생체 내에 산화적 스트레스를 야기시킨다.

사염화탄소에 의한 산화적 스트레스는 간을 포함한 다양한 조직의 지질과 산화를 유발함으로써 조직 내의 지질과산화 산물인 malondialdehyde (MDA)의 양을 증가시킨다.

본 실험에서는 마우스에서 사염화탄소로 유발된 간조직 및 혈장내의 MDA의 증가에 대하여 프로폴리스 시작품의 억제효과를 관찰하였다.

1) 간조직내의 지질과산화물 억제 효과

간 조직에서 지질과산화물인 MDA의 양을 측정한 결과, 대조군 마우스 (0.51 nmol/mg protein)에 비하여 사염화탄소를 투여한 마우스 (1.41 nmol/mg protein)에서는 약 3배 MDA의 양이 증가하였다(Fig. 30).

그러나 사염화탄소 투여 전 4일간 시작품을 10 mg/kg B.W. 또는 20 mg/kg B.W.의 용량으로 경구 투여시킨 마우스에서는 사염화탄소 투여 마우스에 비해 MDA의 양이 크게 감소하였다($p < 0.01$)(Fig. 30).

즉, 프로폴리스 시작품의 경구섭취는 사염화탄소에 의해 유발된 간조직 내의 산화적 손상을 유의적으로 억제하는 것으로 나타났다.

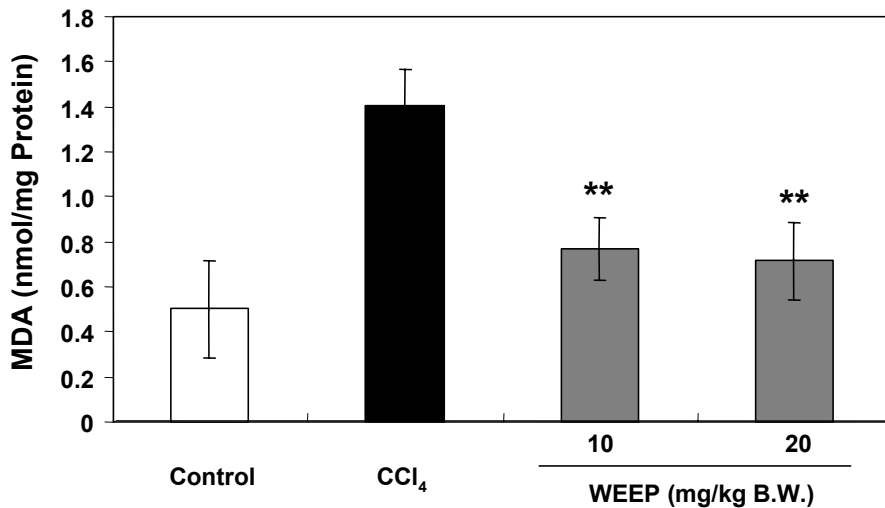


Figure 30. Inhibitory effects of WEPP on CCl₄-induced lipid peroxidation in mouse liver tissue.

2) 혈장내의 지질과산화물 억제 효과

혈장(plasma)에서 지질과산화물인 MDA의 양을 측정한 결과에서도 마찬가지로 대조군 마우스에 비하여 사염화탄소를 투여한 마우스에서는 MDA의 양이 약 2배로 증가하였다(Fig. 29). 그러나 사염화탄소 투여 전 4일간 시작품을 10mg/kg B.W. 또는 20 mg/kg B.W 용량으로 경구투여시킨 마우스에서는 MDA의 양이 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$) (Fig. 31).

따라서 프로폴리스 시작품의 경구섭취는 사염화탄소에 의해 유발된 혈장내의 지질과산화물의 양을 유의적으로 억제하는 것으로 관찰되었다.

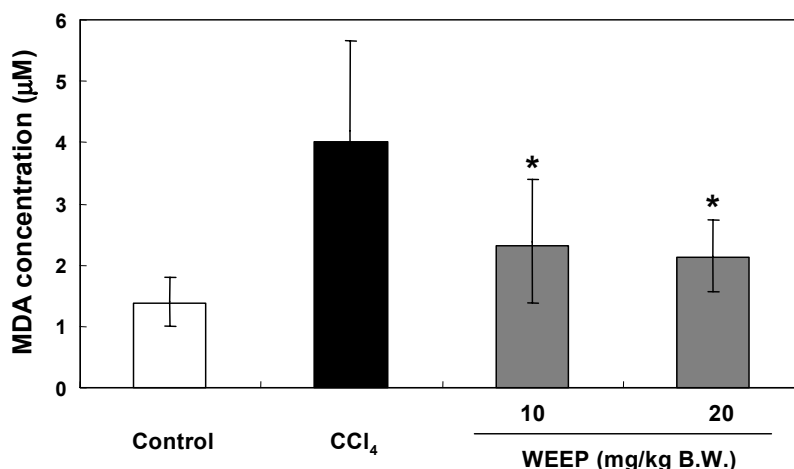


Figure 31. Inhibitory effects of WEPP on CCl₄-induced lipid peroxidation in mouse plasma.

나. 방사선 조사 마우스에서 면역조혈계 보호 효과

방사선(감마선)은 생체 내에 산화적 손상을 일으키며, 특히 면역 및 조혈계 세포가 방사선에 의한 손상에 아주 민감하다.

따라서 본 연구에서는 방사선에 의한 면역 및 조혈계 손상에 대한 시작품의 보호효과를 검증하기 위하여, 면역 및 조혈세포를 생산하는 골수세포에 대한 산화적 염색체 손상을 측정하는 미소핵형성시험과, 조혈모세포의 생존율을 측정하는 비장집락형성시험을 수행하여 시작품의 면역조혈계 보호효과를 관찰하였다.

1) 골수세포의 염색체 손상(미소핵 형성) 경감 효과

방사선을 전신조사한 마우스에서는 면역조혈계가 큰 손상을 입게 된다. 특히 골수는 면역 및 조혈세포를 생산하는 기관으로서, 골수세포의 산화적 손상은 면역 및 조혈계 장애를 유발한다.

본 실험에서는 골수세포의 산화적 손상 정도를 측정할 수 있는 미소핵형성 시험을 통하여 프로폴리스 시작품이 골수세포의 산화적 손상을 억제하는 효과를 관찰하였다.

방사선(3 Gy의 감마선)을 조사한 마우스의 골수세포에서는 미소핵 형성이 약 10배로 증가하였다(Fig. 32).

프로폴리스 시작품을 방사선 조사 전후에 25 또는 50 mg/kg B.W.의 용량으로 경구 투여시킨 마우스에서는 미소핵 형성이 유의적으로 감소하였으며($p<0.01$), 방사선에 의한 미소핵 형성을 50% 수준으로 경감하는 효과가 관찰되었다(Fig. 32).

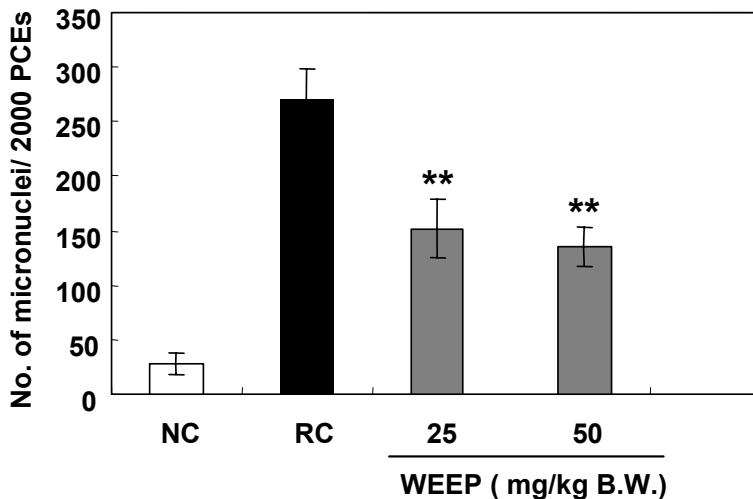


Figure 32. Inhibitory effects of WEEP on radiation-induced micronuclei formation in mouse bone marrow cells.

2) 조혈모세포의 생존 (비장 내 집락 형성) 증가 효과

방사선을 전신조사한 마우스에서는 방사선에 민감한 비장세포들이 급격히 소실된다. 그러나 소실된 비장세포를 보충하기 위하여 골수내의 조혈모세포들이 비장으로 이동하여 증식 분화함으로써 방사선 조사 후 9-10일 정도 후에 비장 표면에는 조혈세포 집락이 관찰된다.

방사선 조사 후 비장표면에 형성되는 조혈세포 집락의 수는 방사선 조사 후 생존한 골수내의 조혈모세포의 수에 비례한다. 따라서 프로폴리스의 시작품에 의한 면역 및 조혈계 보호효과를 관찰하기 위하여 시작품 섭취의 방사선 조사 마우스의 비장 내 집락형성에 대한 효과를 관찰하였다.(Fig. 33) 방사선(6.5 Gy의 감마선)을 조사한 마우스의 비장에서는 약 3.9개의 집락이 관찰되었다.

그러나 방사선 조사전후로 시작품을 10 또는 20 mg/kg B.W. 용량으로 경구 투여시킨 마우스에서는 각각 평균 9.0과 7.7개의 집락이 관찰되어 방사선조사 대조군에 비해 유의적으로 비장집락이 증가하였다($p < 0.05$).

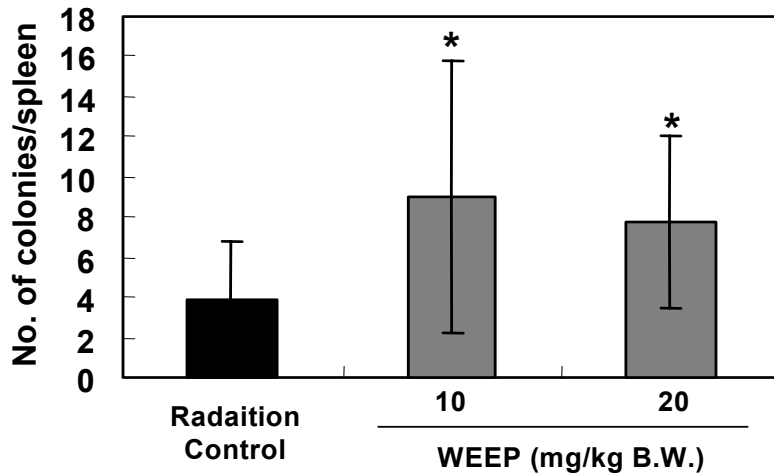


Figure 33. Promotive effects of WEPP on endogenous spleen colony formation in irradiated mice.

4. 결론

본 연구에서는 항산화 활성이 가장 뛰어난 국내산 프로폴리스(P12)를 이용하여 제조한 무알콜, 수용성 (WEPP)프로폴리스 시작품의 생체 내 항산화 활성을 비교 검증하였다.

그 결과 시작품을 경구 섭취한 마우스에서는 사염화탄소로 유발된 간조직 및 혈장내의 지질과산화물(MDA)의 양이 유의적으로 감소하는 것이 관찰되었다.

또한 시작품은 방사선에 의한 산화적 손상으로부터 면역 및 조혈계(골수세포 및 조혈모세포)를 보호하는 효과가 관찰되었다.

이러한 결과는 국내산 프로폴리스를 이용하여 개발된 무알콜 수용성 프로폴리스가 생체내의 산화적 손상을 억제하고 면역 조혈계를 보호하는 효과가 뛰어남을 보여주어 항산화 식품으로서 임상적으로 적용 가능성을 시사하였다.

제 5 절 프로폴리스 시작품의 항산화 및 면역 활성 보호 인체시험

1. 개요

본 연구에서는 무알콜, 수용성(WEEP) 프로폴리스 시작품의 인체에서의 항산화 및 면역 활성 보호효과를 검증하기 위하여 임상시험을 수행하였다. 본 연구에서는 고강도 운동으로 인한 인체 내 산화적 손상 유발 모델을 이용하여 시작품의 효과를 검증하고자 하였다.

규칙적인 운동은 체중조절, 정신적 안락감 및 스트레스 해소 등에 이점이 있고, 심혈관계 질환의 위험율을 떨어뜨리며, 적절한 운동을 통해서 생체의 활성을 증진시킬 수 있다. 하지만 고강도 운동은 유해활성산소를 생성시켜 여러 세포에 산화적 손상을 일으킨다. 활성산소는 세포막을 손상시켜 지질과산화를 유발하여 혈장내의 MDA 함량을 증가시키며, 조직을 손상시킴으로써 급성 염증 면역반응을 일으킨다(11, 12).

본 연구에서는 다양한 flavonoid를 함유하고 있는 프로폴리스를 이용해 개발한 무알콜 수용성 프로폴리스 시작품의 항산화 효과 및 면역활성 보호효과를 알아보고자 고강도 운동 후 나타나는 급성운동반응, 즉 지질과산화물 생성과 염증 면역반응 관련 cytokine의 양에 대한 시작품의 억제효과를 관찰하고자 하였다.

2. 연구방법

가. 인체시험 설계

본 연구에서는 프로폴리스 시작품의 항산화 및 면역활성 보호효과를 검증하기 위하여 시작품의 섭취전후에 고강도 운동부하검사를 실시하고, 운동부하 전후의 혈액을 채취하여 항산화 지표(혈장내 MDA 함량 및 총항산화능)와 면역 활성 지표(혈청내 IL-6 및 TNF- α 농도)를 측정하였다(Fig. 34). 플라시보 및 프로폴리스 시작품을 2주간 섭취한 후 섭취전후 및 그들 간 지표의 차이를 통계적으로 검정하여 항산화 및 면역활성 보호효과를 구

명하고자 하였다.

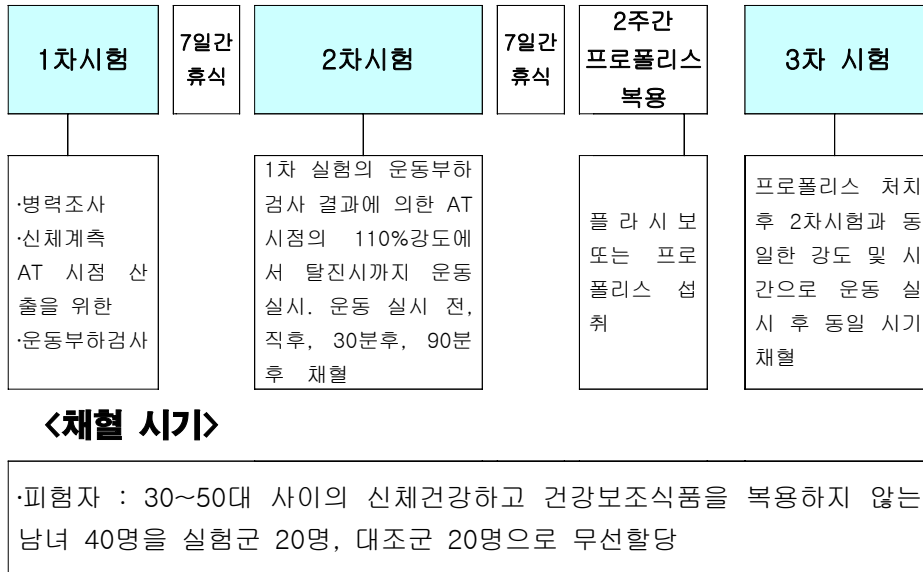


Figure 34. 임상시험 설계 개요도

나. 피험자 선정

30~50대 중 질병이 없이 건강하고 최근 6개월 이내에 장기적으로 약물이나 항산화 보충제를 섭취하지 않으며, 최근 6개월 이내에 주당 3회, 1회 30분 이상 규칙적인 운동에 참여하지 않은 사람을 대상으로 하였다.

본 실험에 대한 피험자 모집공고를 인터넷을 통해 공지하고 지원자 중 본 실험에 대한 자세한 설명을 듣고 연구목적을 이해하며 자발적인 참여의사를 밝힌 사람을 대상으로 문진을 통해 병력을 조사하여 연구목적에 적합한 조건을 갖춘 자로 40명을 선발하여 프로폴리스 섭취군과 대조군에 무작위 배정하였다.

다. 실험설계

1) AT110% 시점 산출을 위한 운동부하검사 실시

대상자에 대한 신체계측 검사 및 혈압과 심박수를 측정하여 피험자들의

기본적인 신체적 특징을 파악하였다.

다음으로 피험자들의 최대 운동능력을 평가하고 무산소성 역치 지점을 산출하기 위해 트레드밀을 이용한 심장운동 부하검사를 실시하였다(Fig. 35). 검사 프로토콜은 3분마다 속도와 경사도가 증가하고 초기 강도는 1.7mph에 10%로 시작하는 bruce 프로토콜을 사용하였고, 검사 중 지속적으로 혈압, 심박수 심전도 등을 관찰하였으며 가스분석이 병행되었다. 운동 종료 후 회복기는 3분까지 측정하였다.



Figure 35. 신체계측 및 혈압측정 과정

2) AT110% 시점의 산출

AT 시점은 운동부하 검사 중 측정된 가스분석결과를 토대로 이산화탄소배출량에 비해 산소섭취량이 급격히 증가하는 지점을 채택하는 V-slope 방법을 이용하여 산출하였다. V-slope를 이용한 방법은 3명의 연구자가 각각 측정한 값을 기준으로 하였으며, 세 명의 결과가 일치하지 않을 경우에는 또 다른 연구자에게 의뢰하여 그 중 2명 이상의 값과 동일한 시점으로 책정하였다. 이렇게 산출된 AT 시점에서의 심박수를 가스분석결과표에서 찾아내어 그 시점에 110%에 해당하는 심박수를 다시 산출하고 2차 실험에 사용할 운동 강도로 결정하였다.

3) 사전 검사

사전검사는 AT110% 시점 산출 실험이 종료된 후 충분히 운동의 피로가 해소된 1주일 후에, 산출된 운동 강도로 피험자가 더 이상 지속하지 못

하겠다고 할 시점까지 트레드밀 운동을 실시하였다(Fig. 36). 먼저 실험실에 내원하여 안정을 취하고 안정 시 채혈을 실시하였다(Fig. 37).

그 후 혈압과 심박수 및 체중을 측정하였다. 운동 강도를 관찰하기 위해 자동심박측정기를 착용하고 bruce 프로토콜 1단계에 해당하는 운동강도(1.7mph 속도, 10% 경사도)로 운동을 시작하였다. 선정된 운동 강도(AT시점의 110%)에 도달될 때까지 매 2분당 1 METs의 운동강도를 올리도록 하였다. 이것은 2분째 2.2mph, 4분째 2.6mph, 6분째 3.1mph, 8분째 3.6mph, 10분째 4mph에 해당하며, 모든 피험자의 사전 설정된 운동 강도에 해당하는 목표 심박수 수준에 도달할 때까지 운동강도를 증가시켰다.

목표 심박수에 도달한 속도에서 지칠때까지 운동을 실시하였다. 채혈은 운동이 끝난 직후와 운동 후 30분, 운동 후 90분 시점에서 각각 10ml씩 정맥혈에서 채취하였다(Fig. 37).



Figure 36. AT110%강도에서 운동 중



Figure 37. 안정 시, 운동 후 채혈

4) 프로폴리스 복용

피험자를 프로폴리스 복용군과 대조군으로 무작위 할당 하고 2주간 각각 프로폴리스와 위약을 복용토록 하였다. 복용 시작은 2차 실험 종료 후 2차 실험에 의한 운동효과가 사라진 시점으로 사료되는 1주일 후부터 시작하였다.

5) 사후검사

시료 복용이 끝난 후 사전검사와 동일한 운동을 시키고 안정 시, 주행이 끝난 직후, 운동 후 30분, 운동 후 90분이 경과한 시점에서 각각 10ml 씩 정맥혈에서 혈액 채취하였다.

라. 프로폴리스 시작품 투여 방법

프로폴리스 시작품은 다음과 같은 방법으로 투여하였다.

- ▶ 프로폴리스 함량 : 110mg/1캡슐
- ▶ 섭취방법 : 경구 투여, 990mg/1일, 1일 3회(1회 3캡슐)
- ▶ 섭취 기간 : 2차 실험 후 1주 후부터 2주간
- ▶ 형태 : 연질캡슐

마. 혈액 내 지표의 측정 방법

사전 및 사후 검사에서 채취한 혈액으로부터 혈장 및 혈청을 분리하여

항산화 및 면역 활성 관련 지표를 측정하였다.

1) 혈장의 총 항산화능(TAS) 측정

혈장의 총 항산화능(Total Antioxidant Status, TAS)은 Randox Laboratories, Ltd (영국)의 TAS kit를 이용하여 측정하였다. 안정한 라디칼인 ABTS 라디칼을 발생시키는 시스템에서 각 혈장시료와 항산화물질인 Trolox의 ABTS 라디칼 소거활성을 비교하여 측정하였으며, 각 혈장시료의 항산화능을 Trolox equivalent (mM)로 환산하여 나타내었다.

2) 혈장 내 lipid peroxidation 지표 (MDA) 측정

제 1 절의 연구방법에서 기술된 혈장내의 MDA 측정방법에 따라 혈장에 포함된 지질과산화물 (MDA)의 양을 TBA 반응법으로 측정하였다.

3) 혈액 내 cytokine 측정

급격한 운동으로 발생된 산화적 스트레스에 의한 염증 면역반응 유발에 대한 프로폴리스 시작품의 방어효과를 관찰하고자 혈청 내의 염증관련 cytokine인 IL-6와 TNF- α 의 농도를 측정하였다. Cytokine의 농도는 R&D Systems 사의 고감도 IL-6 및 TNF- α ELISA kit를 이용하여 측정하였다.

바. 통계적 처리

두 집단의 동질성을 검증하기 위하여 집단(위약군, 프로폴리스섭취군)간 신체계측 및 기초 자료 각 변인의 평균과 표준편차를 구하고, independent t test를 실시하였다.

처치시기에 따른 집단과 처치시기별 측정시기(안정 시, 운동직후, 운동 후 30분, 운동 후 90분)에 따른 각 변인별 변화의 유의한 차이를 검증하기 위하여 Three way repeated ANOVA를 사용하여 분석하였다. 통계적 처리는 SPSS 12.0 통계 프로그램을 사용하여 실시하였다.

각 측정시기별로 집단과 프로폴리스섭취에 따른 변인들의 유의한 차이를 알아보기 위해서 대비검정(contrast test)을 실시하였다. 모든 분석의 통계적 유의수준은 0.05로 하였다.

3. 연구결과

총 참여한 40명의 피험자들을 이중맹검법을 사용하여 시험을 진행하고 결과를 분석하였다.

자료의 분석은 초기 선발된 40명의 피험자 중 시험진행 및 분석과정에서 자료가 오염된 것으로 생각되는 위약군과 프로폴리스 섭취군에서 5명씩의 자료를 missing value 처리하고 각각 15명씩을 분석하였다.

자료의 오염은 지속적인 전화 모니터링에도 불구하고, 복용을 지속하지 못하거나 감기 등의 단발 질환, 채혈 시 스트레스로 인한 혈액의 용혈 등이 해당하였다.

가. 피험자의 신체적 특성

두 집단의 연령비를 균등하게 하기 위해서 피험자들을 연령별로 정렬하여 양분하는 제한적 무선헌당을 실시하였다. 두 집단의 신체적 특성의 차이는 통계적으로 유의하지 않았으며 그 결과는 Table 27 과 같다.

나. 혈장 내 지질과산화물(MDA) 분석 결과

MDA의 분석 결과 통계분석의 모든 모형에서 반복요인에 대한 구형성 가정이 만족되었으며, 그 결과는 아래와 같이 Table 28 에 제시하였다. 데이터에 대한 통계적 분석결과는 다음과 같다.

MDA에 대한 그룹, 섭취전후, 측정시기의 상호작용 효과는 통계적으로 유의하지 않았다.

MDA에 대한 그룹과 섭취전후의 상호작용 효과는 통계적으로 유의하지 않았다.

MDA에 대한 그룹과 측정시기의 상호작용 효과는 통계적으로 유의하지 않았다.

Table 27. 피험자의 신체적 특성 및 운동능력검사결과

구분	위약군 평균 ± 표준편차	프로폴리스섭취군 평균 ± 표준편차	P
나이(yr)	44.53 ± 7.52	44.73 ± 7.38	NS
신장(cm)	160.47 ± 8.11	160.60 ± 9.32	NS
사전체중(kg)	58.47 ± 11.78	61.08 ± 12.78	NS
사후체중(kg)	59.06 ± 11.72	61.50 ± 12.66	NS
근육량(kg)	41.31 ± 9.88	42.66 ± 9.65	NS
체지방량(kg)	14.76 ± 3.66	15.04 ± 4.90	NS
체지방률(%)	25.41 ± 5.35	24.77 ± 5.53	NS
최대산소섭취량(ml/kg/min)	37.40 ± 4.99	37.95 ± 4.47	NS
AT시점에서의 산소섭취량(ml/kg/min)	25.03 ± 4.31	27.82 ± 3.63	NS
AT110%의 심박수(bpm)	148.00 ± 15.12	148.27 ± 11.34	NS
AT110%의 %VO2(%)	67.15 ± 9.77	73.47 ± 6.98	NS
안정시 심박수(bpm)	75.73 ± 12.22	75.07 ± 11.31	NS
최고심박수(bpm)	178.13 ± 8.78	173.60 ± 12.71	NS
안정시 수축기혈압(mmHg)	109.87 ± 13.26	105.93 ± 13.66	NS
안정시 이완기혈압(mmHg)	72.47 ± 7.73	72.33 ± 8.05	NS
최고 수축기혈압(mmHg)	171.00 ± 22.38	172.80 ± 26.54	NS
최고 이완기혈압(mmHg)	81.20 ± 13.97	84.27 ± 14.25	NS

Table 28. 혈장 내 MDA 변화에 대한 통계 분석 결과

source	SS	df	MS	F	P
섭취 전후	.240	1	.240	.536	.471
섭취전후 * 그룹	.998	1.000	.998	2.226	.148
오차(섭취 전후)	11.660	26	.448		
측정시기	.712	3	.237	1.914	.134
측정시기 * 그룹	.458	3	.153	1.233	.304
오차(측정시기)	9.669	78	.124		
섭취전후 * 측정시기	.092	3	.031	.272	.846
섭취전후 * 측정시기 * 그룹	.594	3	.198	1.755	.163
오차(섭취전후*측정시기)	8.795	78	.113		

혈장 내 지질 과산화정도의 지표인 MDA 분석을 통해 산화적 스트레스의 정도를 분석한 결과 두 집단 간 섭취전후, 측정시기별 통계적으로 유의한 차이는 없었으나, Fig. 38에서 보는 바와 같이 프로폴리스 섭취군에서 섭취 후 운동직후에서 MDA 수준이 낮게 측정되었고, 전반적으로 위약군에 비해 MDA 수준이 낮아지는 경향을 보이고 있다.

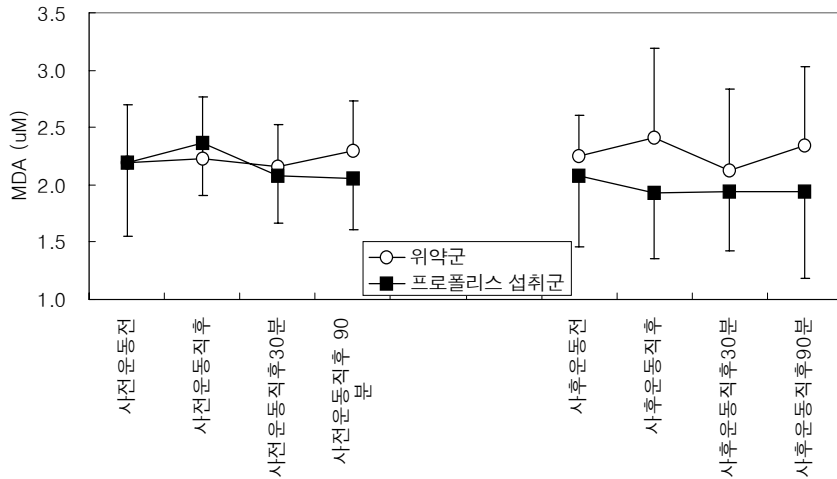


Figure 38. 그룹별 시작품 섭취 전후의 혈장 내 MDA 변화

다. 혈장 내 총항산화능(TAS) 분석 결과

TAS의 분석 결과 반복 요인 중 섭취전후, 측정시기 등의 각각에 대한 구형성 가정은 만족하여 Table 29과 같이 일변량 검정 결과를 제시하였으며, 섭취전후*측정시기의 구형성 가정은 만족되지 않아 다변량 검정 통계량인 Wilks- Λ 로 결과를 Table 30와 같이 제시하였다.

TAS에 대한 그룹, 섭취전후, 측정시기의 상호작용 효과는 통계적으로 유의하지 않았다.

TAS에 대한 그룹과 섭취전후의 상호작용 효과는 통계적으로 유의하지 않았다.

TAS에 대한 그룹과 측정시기의 상호작용 효과는 통계적으로 유의하지 않았다.

Table 29. TAS 변화에 대한 통계분석 결과

source	SS	df	MS	F	P
섭취 전후	0.001	1	0.001	0.005	0.946
섭취전후 * 그룹	.082	1	.082	.721	.404
오차(섭취 전후)	2.968	26	.114		
측정시기	.097	3	.032	4.383	.007
측정시기 * 그룹	.027	3	.009	1.234	.303
오차(측정시기)	.575	78	.007		

Table 30. TAS의 섭취전후*채혈시기 상호작용효과의 변화

source	Wilks's Λ	F	df _{Hypo}	df _{error}	P
섭취 전후 * 측정시기	.798	2.026	3.000	24.000	.137
섭취전후 * 측정시기 * 그룹	.862	1.285	3.000	24.000	.302

혈장 내 총 항산화 능력의 지표로 분석된 TAS 값은 두 변인의 상호작용 효과에서는 유의한 차이를 보이지 않았으나, Fig. 39에서와 같이 프로폴리스 섭취군에서는 운동직후 위약군에서와는 달리 증가하는 경향을 보이고 회복기동안에 상승하는 경향을 보이고 있다.

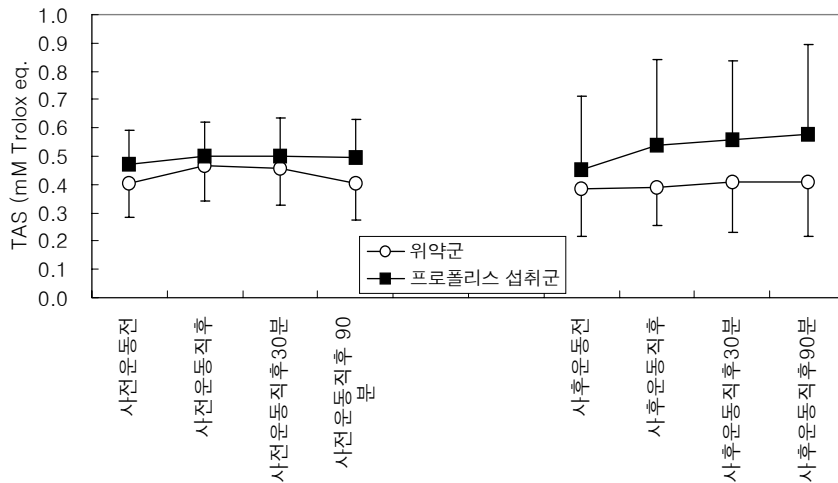


Figure 39. 그룹별 시작품 섭취 전후의 혈장내 TAS 변화

라. 혈청 내 TNF- α 농도 분석 결과

TNF- α 의 분석 결과 통계분석의 모든 모형에서 반복요인에 대한 구형성 가정이 만족되었으며, 그 결과는 Table 31 에 제시하였다.

TNF- α 에 대한 그룹, 섭취전후, 측정시기의 상호작용 효과는 통계적으로 유의하지 않았다.

TNF- α 에 대한 그룹과 섭취전후의 상호작용 효과는 통계적으로 유의하지 않았다.

TNF- α 에 대한 그룹과 측정시기의 상호작용 효과는 통계적으로 유의하지 않았다.

Table 31. 혈청 내 TNF- α 농도 변화에 대한 통계분석 결과

source	SS	df	MS	F	P
섭취 전후	.002	1	.002	.008	.929
섭취전후 * 그룹	3.296E-07	1	3.296E-07	.000	.999
오차(섭취 전후)	5.660	20	.283		
측정시기	.055	3	.018	0.684	.565
측정시기 * 그룹	.119	3	.040	1.470	.232
오차(측정시기)	1.619	60	.027		
섭취전후 * 측정시기	.164	3	.055	1.841	.149
섭취전후 * 측정시기 * 그룹	.105	3	.035	1.181	.325
오차(섭취전후*측정시기)	1.785	60	.030		

급성 운동에 대한 스트레스 반응에 대해 운동 후 일어나는 염증 작용의 지표로 혈청 내 TNF- α 농도를 분석한 결과 집단 간 섭취전후, 측정시기별 통계적으로 유의한 차이는 없었다. (Fig. 40)

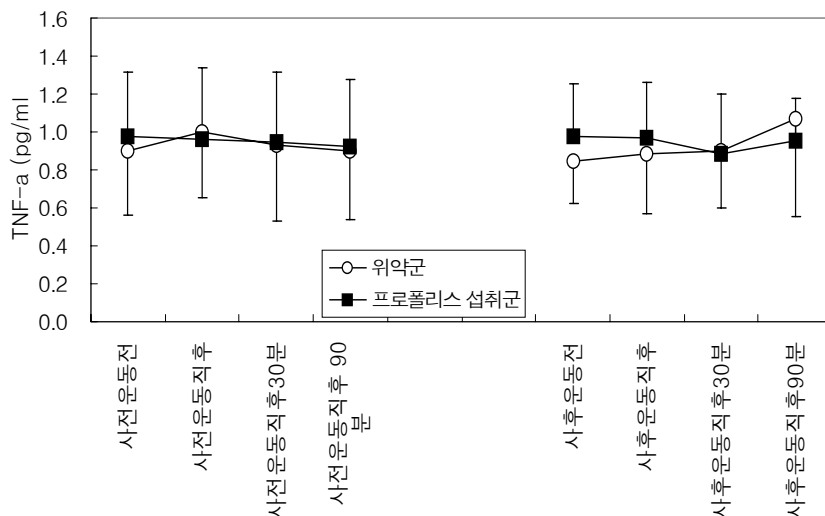


Figure 40. 그룹별 시작품 섭취 전후의 혈청 내 TNF- α 농도 변화

마. IL-6의 분석 결과

두 가지 반복요인을 동시에 고려한 섭취전후와 측정시기의 상호작용은 구형성 가정을 만족하지 않아 다변량 검정 통계량인 Wilks- Λ 로 결과를 Table 32 과 같이 제시하였다.

IL-6에 대한 그룹, 섭취전후, 측정시기의 상호작용 효과는 통계적으로 유의하지 않았다.

IL-6에 대한 그룹과 섭취전후의 상호작용 효과는 통계적으로 유의하지 않았다.

IL-6에 대한 그룹과 측정시기의 상호작용 효과는 통계적으로 유의하지 않았다.

Table 32. 혈청 내 IL-6 농도 변화에 대한 통계분석 결과

source	Wilks Λ	F	df _{Hypo}	df _{error}	P
섭취전후	.583	14.287(a)	1.000	20.000	.001
섭취전후 * 그룹	.995	0.110(a)	1.000	20.000	.743
측정시기	.627	3.565(a)	3.000	18.000	.035
측정시기 * 그룹	.977	.144(a)	3.000	18.000	.932
섭취전후 * 측정시기	.958	0.262(a)	3.000	18.000	.852
섭취전후 * 측정시기 * 그룹	.911	.588(a)	3.000	18.000	.631

* P<.05

급성 운동에 대한 스트레스 반응에 대해 운동 후 일어나는 염증반응의 지표로 IL-6를 분석한 결과 집단 간 섭취전후, 측정시기별 통계적으로 유의한 차이는 없었으며 두 집단간 변화 추이도 변화가 없었다(Fig. 41).

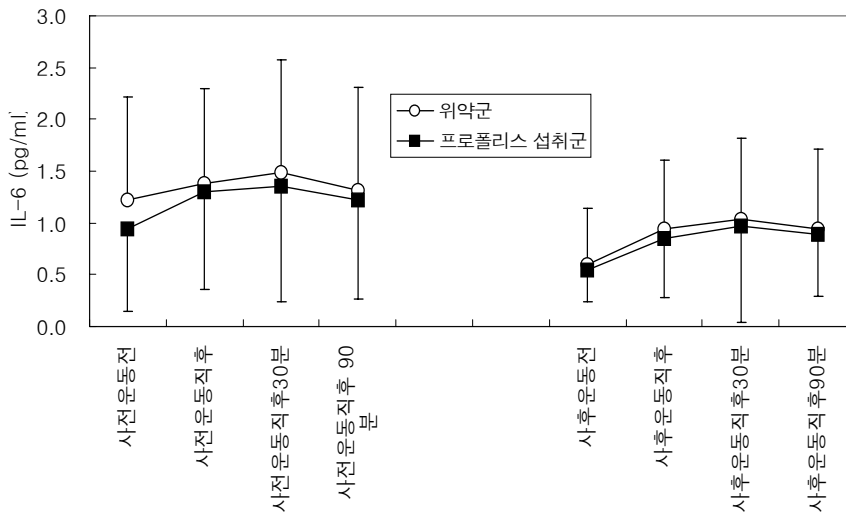


Figure 41. 그룹별 시작품 섭취 전후의 혈청 내 IL-6 농도 변화

4. 결론

국산 프로폴리스의 항산화 및 면역 활성 보호효과를 검증하기 위해서 2주간 프로폴리스를 섭취시키고 운동유발성 과산화지질 생성 정도 및 항산화 능력을 분석한 결과 프로폴리스를 섭취한 그룹과 위약군간에 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았으나 프로폴리스 섭취군에서 MDA가 처치 전에 비해 낮아지는 경향을 보이고 반면 TAS는 높아지는 경향을 보여 국산 프로폴리스의 항산화 효과가 있는 것으로 사료된다.

한편 면역반응과 관련된 염증반응 인자인 IL-6와 TNF- α 의 분석결과에서 두 집단간에 통계적으로도 유의한 차이나 경향성을 발견하지는 못하였다. 프로폴리스 섭취군의 처치전후를 비교해보면 이들 변인의 변화경향이 없는 것으로 보아 염증반응을 일으킬 만큼 충분한 운동자극에 도달하지 못하였다고 사료된다.

그럼에도 불구하고 항산화 능력이 향상되는 경향으로 보아 국산 프로폴리스가 중정도 강도의 운동 후에도 산화적 스트레스를 감소시키고 항산화 능력을 개선시키는 긍정적인 효과가 있는 것으로 사료된다.

제 6절 무알콜·수용성 프로폴리스의 시장성 평가

1. 개요

프로폴리스는 건강보조식품 뿐 아니라 의약품, 화장품, 생필품 등 다양하게 응용이 가능하지만 신청기업은 프로폴리스를 추출하고 이를 원료로 사용하여 먼저 프로폴리스 건강보조식품을 제조하는데 주 계획을 갖고 있다. 따라서 본 장에서는 프로폴리스의 주요 시장인 건강보조식품 시장의 개요와 구조 및 특성 등을 살펴보고, 국내외 시장동향, 업체동향, 향후전망 등을 분석하였다.

2. 연구방법

다양한 프로폴리스 관련 도서와 논문, 한국과학기술정보연구원(KISTI)의 시장분석 보고서, 하나증권의 ‘고성장예상 건강기능성식품’ 등을 참고로 하여 수용성 프로폴리스의 시장성을 평가하였다.

3. 연구결과

프로폴리스는 건강보조식품 뿐 아니라 의약품, 화장품, 생필품 등 다양하게 응용이 가능하지만 신청기업은 프로폴리스를 추출하고 이를 원료로 사용하여 먼저 프로폴리스 건강보조식품을 제조하는데 주 계획을 갖고 있다. 따라서 본 장에서는 프로폴리스의 주요 시장인 건강보조식품 시장의 개요와 구조 및 특성 등을 살펴보고, 국내외 시장동향, 업체동향, 향후전망 등을 분석하였다.

가. 시장 개요 및 특성

1) 시장 개요

최근 생활수준의 향상과 웰빙이 새로운 라이프스타일로 자리 잡으면서, 건강지향 욕구가 증대되었다. 또한 인터넷을 비롯한 각종 미디어의 보급과 발달로 대체의학과 자가 치료 및 건강 정보에 대한 일반인들의 접근이 점점 용이해지고 있고, 일반인들도 전문가들 못지않은 건강 관련 지식수준을 보이고 있으며, 건강 문제에 관련한 이슈에 대해서는 상당히 민감한 반응을 보이기 시작했다.

그리고, 고령화 사회로 접어들면서 병은 발병 후 의학적으로 치료되어야 한다는 과거의 사고방식이 변하여 치료보다는 예방이 우선되어야 한다는 사고방식을 갖게 되었고, 병의 예방을 위해서는 식생활의 패턴과 개선이 중요하다는 것을 인식하게 되었다.

또한, 식생활 습관이 질병과 매우 밀접한 관계가 있다는 과학적 증거가 속속 드러나면서 식생활의 변화를 통해 건강을 증진시키고자 하는 소비자들이 빠르게 늘어나고 있다.

이 모든 것에 기인해 건강기능성식품 시장은 증가할 것으로 예상되며, 하나증권의 이슈분석 '고성장이 예상되는 건강기능성식품 시장'에 따르면 세계 건강기능성식품 시장규모는 연평균 11% 수준의 성장이 예상되고 있다. 건강기능성식품 시장에서는 소득수준과 경제규모에서 우위인 선진국(미국, 일본, 유럽) 위주로 시장이 형성되어 있다.

우리나라의 경우도 국민소득이 점차적으로 증가하고 있고, 고령인구비율이 증가하고 있는 것으로 보아 건강기능성식품 시장이 커질 것으로 예측된다. 또한, 건강기능성식품 법률에서는 건강기능성식품의 기능성 및 유용성이 과학적으로 검증되면 건강기능식품 품목으로 인정하고 있어 건강기능성식품의 범위는 늘어날 것으로 예상된다.

현 법규 하에서의 건강기능성 식품은 건강보조식품 등 총 32개 군으로 한정되어 있지만 전술한 바와 같이 추가적으로 확대될 것으로 예상되며, 이로 인해 시장이 확대 될 전망이다.

건강보조식품의 한 분류인 프로폴리스는 주도국인 일본에서는 건강식품

소재로써 1985년부터 이용되기 시작하였다. 프로폴리스는 전체 건강식품 중 10위의 자리를 차지하고 있을 정도로 중요한 위치를 차지하고 있다. 그 중 80% 이상은 에탄올추출 프로폴리스가 점유하고 있다.

프로폴리스는 다양한 생리활성을 가지고 있는 플라보노이드를 포함하여 여러 화합물질로 된 복합물로서, 항균 및 항산화 작용, 항암작용, 세포내 각종 영양분 전달 분열·증식을 도우며, 진통마취, 헬리코박터균 활성 억제 등에도 효과가 있는 것으로 밝혀지면서 이러한 효능을 목적으로 한 제품개발이 연이어 이루어지고 있다.

국내에서는 1990년대 중반부터 프로폴리스 시장이 형성되기 시작하였다. 프로폴리스는 건강기능성식품 중 서른 두번째로 인가를 받아 식약청에서 관리하고 있으며, 항균 및 항산화 작용에 관한 기능성을 공식적으로 인정받았다. 그러나 프로폴리스가 국내에서는 많이 알려져 있지 않기 때문에 국내시장에서 프로폴리스가 차지하는 비중은 아직 미약하다.

2) 시장 특성

프로폴리스 식품시장은 다음과 같은 특징을 나타낸다.

가) 경기 변동 및 대형 환경 재해 사건에 따른 수요 탄력성

건강기능성식품은 경기변동에 따라 그 수요가 크게 좌우되는 특성을 가진다. 특히 프로폴리스 식품시장의 경우 경기변동 뿐만 아니라 사스, 독감 바이러스, 조류 독감 등의 대형 환경 재해 예방차원에 따라서 그 수요량이 크게 영향을 받는다.

나) 제품차별화가 용이하지 않은 시장

건강기능성식품은 대부분의 식품업체 및 제약업체가 지향하는 제품이고 부가가치화 전략 방향이기도 하고 또 제품에 대한 원료는 국제시장에서 어렵지 않게 구입할 수 있으므로 제품측면에서의 시장진입장벽은 높지 않다고 할 수 있다. 따라서 프로폴리스 식품 시장에는 다양한 브랜드의 제품이 존재하고 있으며 이들 브랜드간의 경쟁은 치열한 편이다. 제품차별화가 용이하지 않는 경우에는 보통 시장에서 경쟁이 심해지고 결국에는 가격경

쟁으로 경쟁패턴이 전환되어 산업전체의 평균기업이익이 감소하며 또 한계 기업들은 시장퇴출의 압력을 받는다. 그리고 프로폴리스 기능성 강화 뿐 아니라 과학적 효능 검증 자료가 확보된 외국소재를 소비자들이 선호하는 경향이 있다.

3) 기회 및 위협 요인

가) 기회요인

건강기능성식품에 대한 소비자의 수요 증대에 따라 2002년 8월에 건강 기능성식품에 관한 법률이 제정, 공포되었고, 동법 시행규칙이 2004년 1월 시행됨에 따라 건강기능성식품의 생산 및 판매 규제가 강화되면서 소비자 신뢰성의 향상 및 장기성장 여건이 구축되었다.

일본(1990년)과 미국(1994년)의 경우에도 건강기능성식품법의 시행 이후 시장 규모가 확대되었다. 이와 같은 맥락에서 프로폴리스의 효능에 대한 소비자의 신뢰도 향상이 시장 확대에 영향을 줄 것이라 예측된다. 그리고 2004년 8월 프로폴리스가 주세법 규정에서 풀리면서 프로폴리스 시장이 확대될 것이라 예상된다.

2003년 사스가 유행을 했을 때 소비자들이 프로폴리스에 관심을 가졌던 것처럼, 환경재해에 의한 전염병 예방에 대한 관심이 고조되고 있을 때가 시장 확대의 기회일 수 있다.

독감 바이러스의 경우 해마다 다른 돌연변이 바이러스들이 유행하고 있기 때문에 매년 독감 철에는 사람들의 관심대상 중 하나 일 수 있고 최근 조류독감바이러스가 유행처럼 번지고 있어 이 역시 프로폴리스에 관심을 돌리게 할 수 있는 기회이기도 할 것이다.

또한, 프로폴리스 업계 조사에 의하면 2001년도의 설문 조사에서 우리나라 국민들 100명 중 3명 정도가 프로폴리스를 알고 있다고 답을 했다고 한다. 그러나 2005년인 현재 100명 중 20여명 정도가 프로폴리스를 인지하고 있으며, 다른 건강보조식품의 경우 인지도가 25-30% 정도가 되면 그 시장이 증가한다는 보고가 있어 국내 프로폴리스 시장의 경우 성장세를 예측하고 있다.

나) 위협요인

건강기능을 표방하는 식품이 범람하고 있고, 향후 유사하거나 기능성이 강화된 새로운 원료와 제품들이 지속적으로 시장에 유입이 가능하여 건강기능성식품 시장에서의 치열한 경쟁이 예상된다. 또한 건강기능성식품법의 시행에도 불구하고 기존 건강기능성식품 중 일부의 허위·과대광고로 인해 여전히 소비자들의 불만과 인식의 왜곡이 존재하고 있다. 따라서 성공적으로 시장을 개척해 나가기 위해서는 풍부한 임상자료와 과학적 자료가 바탕이 되어야 한다.

나. 국내외 시장현황 및 전망

1) 세계시장 현황

가) 시장규모

프로폴리스 시장은 특히 동향에서도 알 수 있듯이 일본이 기술개발에서 가장 주도적이면서 그 시장 규모가 가장 크다. 일본은 1985년 나고야에서 개최된 제 30회 세계양봉회의부터 프로폴리스 시장이 형성되어 지금은 건강보조식품 중에서 인기상품으로 다년간 선두권을 유지하고 있다. 금액면에서도 프로폴리스 건강식품은 1996년에 200억엔을 초과하였으며 전문리서치회사의 통계에 따르면 프로폴리스 상품의 소비자시장 규모는 370억엔(2000년)으로 일본 전체 국민의 40% 정도가 프로폴리스의 존재를 인식하고 있다고 한다(Table 33).

2001년은 전체 건강보조식품 시장의 5%에 달하는 400억엔 규모의 시장을 가진 것으로 알려져 있다. 35 품목 중 말기 암환자의 건강식품 복용으로 프로폴리스가 2위로 애용되었다(Fig. 42).



Figure 42. 일본 요미우리신문 (2002.10.19)

Table 33. 일본 프로폴리스 시장 규모 추이 및 추정

(단위: 억원)

연도	1996	2000	2001	2003	2004	2005	CAGR
프로폴리스 시장	2000	3700	4000	5280	6066	6970	14.9%

일본에서는 몇 년 전부터 TV 프로그램과 관련 잡지 등 각종 매스컴에서의 관심이 프로폴리스 시장규모에 적지 않은 영향을 미치고 있는 것으로 파악되고 있다.

최근 다른 소재와 결합한 형태의 새로운 스타일의 건강보조식품의 출시, 일반식품으로의 활발한 응용 등 기존 프로폴리스의 개념을 새로운 제품에 응용한 제품시장이 그 입지를 넓혀가고 있다.

일본의 프로폴리스 제조회사들은 이러한 시장상황에 유동적으로 대처하여 신제품 출시를 위한 연구와 신 규격 원료의 개발을 적극적으로 추진하고 있는 상황이다. 현재 프로폴리스 약품계, 식품계 점포 등에서 실제 매출 현황의 괄목할만한 큰 변화는 없으나 프로폴리스 제품은 항상 매출 상위권

을 차지하고 있다.

이렇게 일본에서의 프로폴리스 시장의 성장은 건강식품에 대한 소비자의 인식이나 구매력 등에도 기인하지만 근본적으로는 제조회사의 독자적인 특허화된 기술로 다양한 소비자의 욕구를 충족시킬 수 있는 제품의 개발과 프로폴리스의 약리작용에 대한 연구 등으로 시장이 점차 확대되었다.

나) 업체동향

현재 일본의 프로폴리스 제품을 취급 하는 기업의 수는 약 300회사에 이른다. 그 중에서 프로폴리스를 취급하는 주요 업체로는 모리카와건강당, 하치노다카라, 하야시바라 등이 있다. 하야시바라 업체는 프로폴리스 추출에 관한 특허를 다른 업체들보다 많이 보유하고 있으며 저 에탄올 함유 제품을 개발하는데 노력하고 있다. 모리카와건강당 업체의 경우는 일본 본사의 연구센터에서 연구실적을 바탕으로 기술 개발과 사업을 동시에 하고 있는 업체이다. 이 업체는 알코올 프로폴리스 추출물을 이용해서 그 유효성 및 유해성 검증 조사를 기반으로 해서 다양한 제품을 개발, 시판하고 있다.

그리고 하치노다카라와 모리카와건강당 업체는 기술력과 일본에서의 경험을 바탕으로 우리나라까지 진출하여 국내 프로폴리스 시장의 업체들과 경쟁하고 있다.

JAPAN NIHON PROPOLIS CO., LTD는 프로폴리스 제품 마케팅에 주력하면서 다른 경쟁 업체들과 차별화하기 위해 프로폴리스 추출 기술에 관한 원천 특허를 확보하기 위해 노력하고 있다.

일본 프로폴리스 업체들은 제품 판매를 위해 매장 루트 뿐 아니라 방문 판매와 네트워크 마케팅 판매 등 멀티레벨마케팅(MLM)까지 잘 활용하고 있다. 즉, 매장판매형태가 안정적 유통구조로 자리를 잡았고, 건강식품의 대표격인 프로폴리스는 제품특성과 인지도의 상승을 동반하며 제품의 효과를 소비자에게 직접 선전하는 설명 판매형 형태의 판매 분야에도 지속적인 매출을 추진하고 있다.

프로폴리스 원료의 주요 생산국인 브라질, 뉴질랜드, 호주에는 각각 Conaps, Comvita, Nature's Gold Products Pty Ltd 등의 기업이 있다. Comvita의 경우 프로폴리스 추출 단계에서는 천연 원료 추출에 관한 기술

력을 가지고 있는 업체에서 협업하고 있고, 일본을 프로폴리스 주요 소비국이라고 판단하여 일본의 프로폴리스 시장 점령을 위해 노력하고 있으며, 수용성제품 개발에 주력하고 있다. 그리고 캐나다와 미국에는 Organika 등의 업체들이 있다.

2) 국내시장 현황

가) 시장규모

국내 프로폴리스 식품 시장은 다국적 브랜드와 국내 건강보조식품업체들 사이의 시장점유율 경쟁이 치열하다. 국내의 경우 프로폴리스에 대한 한국식품공전 등재가 확정된 1996년에 프로폴리스 식품의 건강보조식품 시장에서의 점유율이 2.8%(1997년 금액 기준)이었다. 1997년에 프로폴리스 시장이 점차 증가했다가 1999년 경기 침체로 인해 프로폴리스 시장을 포함한 건강보조식품 시장이 감소 추세를 보였다.

그 이후 프로폴리스에 대한 인식이 높아지면서 방문 판매 및 다단계판매와 같은 유통망을 통해 소비가 증대되어 2000년과 2001년의 경우 각각 신장율 150% 및 171%를 보였다.

2002년은 2001년과 비슷한 현황을 보여주었으며, 2003년도에 들어서면서 큰 폭의 감소세로 돌아섰다(Table 34).

2003년도에 이처럼 하락폭이 컸던 것은 건강보조식품 시장 전체가 마이너스 성장을 한 것과 같은 맥락에서 이해할 수 있다.

건강보조식품 시장의 특성상 일상적으로 섭취하는 일반 식품과는 달리 국내 경제여건과 매우 밀접한 관계를 갖고 있는 것으로 추정되며, 2003년은 경기악화로 기능성식품관련 특허수도 많이 감소했던 연도이다.

게다가 클로렐라가 등장하면서 2003년 히트상품으로 선정이 될 만큼 클로렐라 수요가 많아 프로폴리스의 매출이 크게 감소한 것으로 보인다.

그러나, 현재 프로폴리스 업체들은 프로폴리스 국내시장 규모가 다시 증가할 것으로 전망하고 있다. 이는 기능식품 품목별 신고현황을 통해서도 알 수 있는데, 프로폴리스의 경우 작년에 비해 품목 신고 현황이 32% 증가하였으며, 이 수치는 다른 기능성식품의 평균 신고율인 25%를 상회하는 수준이다. 현재 국내 프로폴리스 건강보조식품 시장 규모는 454억원 정도

로 추정된다.

Table 34. 국내 프로폴리스 건강보조식품 시장 규모 추이

(단위: 억원)

연도	1998 (실 적)	1999 (실적)	2000 (실적)	2001 (실적)	2002 (실적)	2003 (실적)	2004 (추정)	2005 (추정)	CAGR
시장	20	18	45	122	120	47	291	454	56.10%

나) 업체동향

국내 프로폴리스 관련 주요 업체로는 두루원, 밀성양봉원, 강원양봉, 설악양봉원, 가보농산 등이 있다. 이 업체들의 경우 주로 원료 추출을 담당하고 있다. 특히, 가보농산은 프로폴리스 채취기 개발과, 프로폴리스 캔디 조성물 및 그 제조방법에 관한 특허를 보유하고 있고, 그 외 프로폴리스 치약, 비누제조, 천연구강청정제에 관해서도 특허출원을 하였다. 프로폴리스 완제품을 수입해서 판매하고 있는 업체로는 비토피아, 비타민하우스, 고구려물산, 경일트레이드, 내츄라바이오 등이 있다. 그리고 국내에 진출한 해외업체로는 한국모리카와, 하치노다카라 등 일본계 업체들이 있다. 그 외에도 보령제약에서 보령 프로폴리스를 제조 및 판매하고 있고, 근화제약에서 근화 프로폴리스를 판매하고 있다.

최근 보령제약의 경우 고가인 프로폴리스만 추출해 판매하기 보다는 벌꿀, 로열젤리, 세어버터 등 기타 여러 가지 기능성 원료와 함께 혼합하여 시판하려는 추세를 보여주고 있으며, 다른 업체들 역시 다른 건강기능원료들과 복합하여 판매하려는 시도가 있다.

4. 결론

향후 프로폴리스 건강식품 시장규모를 예측하려할 때 과거의 데이터를 이용하여 과학적인 방법으로 예측하는 것이 합리적일 것이다. 그러나 프로폴리스의 건강식품 시장은 사스, 독감 바이러스 등의 대형 환경 재해나 경

기변동에 의해 시장의 상황이 크게 변동하는 시장이며, 건강보조식품의 경우 제품 주기가 다른 제품들에 비해 짧은 편이므로 5년 후까지의 미래의 시장을 예측하기가 쉽지는 않다. 또한 국내 프로폴리스 업체들의 경우 영세한 곳이 많고 꿀과 로얄제리 외 다른 건강보조식품들을 취급하면서 프로폴리스를 보조물로서 같이 취급하는 곳이 많아 프로폴리스만의 시장자료 수집이 어려운 상황이다.

따라서 미래의 시장을 예측하기 위해서 적절한 가정을 도입하지 않을 수 없다. 시나리오 I(Table 35)에서는 업계 종사자들의 의견을 수렴하여 향후 5년 후의 시장을 예측하였으며, 시나리오 II(Table 36)에서는 국내 건강보조식품의 시장 규모와 성장률을 바탕으로 프로폴리스의 건강보조식품 시장 점유율이 향후 5년 후 지속된다는 가정을 통해 수요예측을 수행하였다.

Table 35. 프로폴리스 건강식품 국내 수요 예측(시나리오 I)

(단위 : 억원)

구 분	2006	2007	2008	2009	2010	증가율(%)
국내시장	475	500	525	550	575	5

시나리오I에서는 향후 5년 동안 프로폴리스 건강보조식품 시장의 연평균 성장률을 5%로 가정하였는데, 이 수치는 업체들의 조사에 의해 최저 성장률로서 결정한 것이다. 이와 같이 연평균 5%의 성장률을 유지할 것이라는 가정 하에서 국내 시장 규모를 추정하였을 경우 2010년 국내 프로폴리스 건강식품시장의 규모는 약 575억원 대에 이를 것으로 예상된다.

Table 36. 프로폴리스 건강식품 국내 수요 예측(시나리오 II)

(단위 : 억원)

	2006	2007	2008	2009	2010	증가율(%)
건강보조식품시장	22440	26928	32313	38775	46530	20
프로폴리스 시장	670	807	970	1163	1395	20

시나리오Ⅱ의 경우는 국내 건강보조식품 시장의 향후 연평균 20% 성장 기대치 와 국내 건강보조식품 시장에 대한 프로폴리스의 연평균 시장점유율3%를 향후 5년 동안 유지할 것으로 가정한 결과이다.

시나리오Ⅱ는 다소 낙관적인 전망의 경우이다. 왜냐하면 건강보조식품에 대한 수요가 지속적으로 증가한다고 하더라도 기능성을 갖고 있는 성분들 사이에 효능 및 가격경쟁을 피할 수 없기 때문이다. 더욱이 건강보조식품은 다른 제품들에 비해 상품화 주기가 짧아 고성장을 하고 있는 건강보조식품시장에서 현재까지의 시장점유율을 계속 유지할 수 있으리라고 기대하는 것은 힘들 수 있다. 따라서 시나리오 I과 시나리오 Ⅱ의 절충치인 약 12.5%의 연평균 성장률을 가정하는 것이 합당하다고 판단된다. 따라서 이에 따른 2010년의 프로폴리스 건강보조식품 국내 시장은 약 910억원 규모로 전망된다.

Table 37. 프로폴리스 건강식품의 2010년 시장 수요예측 종합

(단위: 억원)

연도	2006	2007	2008	2009	2010	CAGR(%)
프로폴리스 시장	568	639	719	808	910	12.5

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 기술개발과제는 국산 프로폴리스의 산지별, 계절별 성분을 비교 분석함으로써 원료선별에 대한 기준을 제시하고, 국내의 건강기능식품법, 주세법 등에 규정된 기준 규격에 적합한 기능성식품의 생산모델을 개발하고 이를 동물실험과 인체적용 실험 즉, 임상실험을 하여 그 기능성을 과학적으로 입증하여 유용성표기의 근거를 제시하는 한편, 세계 시장에서도 충분한 경쟁력을 가지는 원료 또는 제품으로 개발하는 것을 목표로 한다.

국내 산지별 프로폴리스 18종을 채취하여 75% 에탄올로 추출하고 추출물을 계산한 후 8종 이상 유효성분을 분석하였고, 각각의 총 플라보노이드 함량을 측정하였다. *Bacillus subtilis* (KCTC 1022), *Salmonella typhimurium* (KCTC 2515), *Candida albicans* (KCTC 7965) 등 유해균에 대한 항균활성과 항생제 내성을 갖는 *Staphylococcus aureus* (CCARM 201), *Pseudomonas aeruginosa* (CCARM 225), *Salmonella* (CCARM 8009), *Escherichia coli* (CCARM 15479) 에도 항균활성을 나타냄을 확인하였다. 또한 In vitro 실험으로 자유라디칼 Scavenging activity 증진 효과 분석, Superoxide 효과 분석, Lipid peroxidation 효과 분석, 산화적 스트레스에 의한 DNA손상 억제효능평가 등을 수행하였다. 그 결과 모든 면에서 우수한 활성을 나타낸 P12, P13을 선별하였고, 이 두 시료를 In vivo 항산화 효능평가(산화적 스트레스에 의한 생쥐 간조직의 지질과산화억제효능 검증)를 통하여 더 우수한 활성을 나타낸 P12를 선별하였다. 선별된 P12를 이용하여 무알콜 수용화 공정법을 개발하고 무알콜 수용성 프로폴리스 시작품을 제작하였다.

이 시작품이 산화적 스트레스에 의한 생쥐 간조직의 지질과산화 억제 효능, 산화적 스트레스에 의한 생쥐 골수세포의 변이 유발 억제 효능, 면역 활성 보호 효과 등 항산화 효능 평가(동물실험)에서 활성이 있음을 확인하였고, 이를 이용하여 임상실험에 쓰일 소프트 캡슐을 제작하였다.

국산 프로폴리스의 항산화 및 면역 활성 보호효과를 검증하기 위해서 2주간 프로폴리스를 섭취시키고 운동 유발성 과산화지질 생성 정도 및 항산화 능력을 분석한 결과 프로폴리스를 섭취한 그룹과 위약군간에 통계적으

로 유의한 차이는 나타나지 않았으나 프로폴리스 섭취군에서 MDA가 처치 전에 비해 낮아지는 경향을 보이고 반면 TAS는 높아지는 경향을 보여 국산 프로폴리스의 항산화 효과가 있는 것으로 사료된다.

한편 면역반응과 관련된 염증반응 인자인 IL-6와 TNF- α 의 분석결과에서 두 집단간에 통계적으로도 유의한 차이나 경향성을 발견하지는 못하였다. 프로폴리스 섭취군의 처치전후를 비교해보면 이들 변인의 변화경향이 없는 것으로 보아 염증반응을 일으킬 만큼 충분한 운동자극에 도달하지 못하였다고 사료된다.

그럼에도 불구하고 항산화 능력이 향상되는 경향으로 보아 국산 프로폴리스가 중정도 강도의 운동 후에도 산화적 스트레스를 감소시키고 항산화 능력을 개선시키는 긍정적인 효과가 있는 것으로 사료된다.

이러한 무알콜·수용성 프로폴리스는 일차적으로 건강기능성식품에 적용될 수 있고, 나아가 화장품, 의약품, 생활용품까지 확대 및 응용될 수 있다. 국내 프로폴리스 건강기능성식품 시장은 2005년 기준으로 약 454억 원 정도에 이르는 것으로 추정되고 있으며, 향후 5년 후에는 연평균 12.5%로 성장하여 2010년 910억원의 시장으로 확대될 전망이다. 그러나 이러한 시장 확대의 전망에도 불구하고 공급측면에서는 기존의 프로폴리스 업체뿐만 아니라 국내에 진출해 있는 다국적 기업들이 이미 국내시장에 프로폴리스 건강기능성식품들을 판매하고 있어 신청기업의 입장에서 볼 때 시장상황이 반드시 유리하다고는 볼 수 없다.

그러나 최근 조류 독감 바이러스가 유행하면서 항균성 건강보조식품의 시장이 더 커질 것이라는 예측도 있고, 지금까지 주로 판매되고 있는 알코올 프로폴리스가 수용성 프로폴리스에 의해 대체된다면 원료공급자로서 어느 정도 안정된 판로를 확보할 수 있을 것으로 예상된다.

따라서 이러한 점들을 전체적으로 고려하여 판단할 때 무알콜·수용성 프로폴리스의 시장성은 비교적 긍정적으로 평가된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

프로폴리스는 항균 및 항산화 기능이 뛰어난 천연물로 천연항생제로 불리 운다. 오늘날 의료과학의 발달에도 불구하고 암 환자와 희귀병은 늘어만 가고 항생제의 내성으로 인해 항생제의 사용량을 점점 증가하여 사회적 의료비가 계속 증가되고 있는 현실이다. 이에 내성이 없고 누구나 쉽게 활용 할 수 있는 천연소재의 항생제가 절실한 때이다. 이에 프로폴리스는 기존 항생제를 대체 할 수 있는 소재이며 이미 건강기능식품, 화장품, 동물약품 등에 항생제를 대체하여 사용이 되고 있어 사회적 의료비를 경감해 나갈 수 있는 대안이 될 수 있다. 또한 보 기술은 원천기술로 천연물 중에서 항균 및 항산화 기능 우수한 프로폴리스의 기능을 다양한 용도 즉, 건강기능식품, 의약품(방사선치료보조제 또는 항생제) 화장품 원료, 비누, 치약, 구강청정제, 샴푸, 의류 등에 적용하는 생활용품, 가축 및 양어의 사료에 첨가하는 항생제를 대체하는 사료첨가제 등 활용범위가 넓다.

제 6 장 참고문헌

1. Gadow, A., Joubert, E., Hansmann, C.F. (1997). Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherol, BHT, and BHA. *J. Agric. Food Chem.* 45, 632-638)
2. Paul, C., Y. Li, C. Mario, P.H. Jia, C. Kanyanga, V.P. Bart, P. Luc, J.V. Arnold, V.B. Dirk, (1998). Structure-Activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. prod.* 61: 71-76.
3. Hogeboom, G.H., (1965). General methods for the isolation of liver cell components: fraction of cell components of animal tissues, *Meth. Enzymol.* 1: 16-19.
4. Na MK, An RB, Lee SM, Hong ND, Yoo JK, Lee CB, Kim JP, Bae KH. (2001). Screening of crude drugs for antioxidative activity. *Kor J Pharmacogn* 32: 108-115.
5. Yeung, S.Y. W.H. Lan, C.S. Huang, C.P. Lin, C.P. Chan, M.C. Chang, J.H. Jeng, (2002). Scavenging property of three cresol isomers against H_2O_2 , hypochlorite, superoxide and hydroxyl radicals. *Food Chem. Toxicol.* 40: 1403-1423.
6. Jentzsch A.M., Bachmann, H., Fürst, P. and Biesalski H. K. (1996), Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic. Biol. Med.* 20(2): 251-256.
7. Ohkawa, H., N. Ohishi, K. Yagi, (1978). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95: 351-358.
8. Punchard, N.A., Kelly, F.J. ed. (1996). Free Radicals, a practical approach, p.214-218, Oxford University Press.
9. Schmid W. (1975). The micronucleus test, *Mutat. Res.* 31: 9-12.

10. Milas L., Hunter N., Ito H., Peters L.J.. (1984). *In vivo* radio-protective activities of diethyl-dithio-carbamate (DDC). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 10: 2335-2343.
11. Suzuki, K., Totsuka M., Nakaji S., Yamada, M., Kudoh, S., Liu Q., Sugawara, K., Yamaya, K., Sato, K. (1999). Endurance exercise causes interaction among stress hormones, cytokines, neutrophil dynamics, and muscle damage. *J. Appl. Physiol.* 87(4): 1360-1367.
12. Vassilakopoulos, T., Karatza, M.H., Katsaounou, P., Kollintza, A., Zakynthinos, S., Roussos, C. (2003). Antioxidants attenuate the plasma cytokine response to exercise in humans. *J. Appl. Physiol.* 94: 1025-1032.
13. G. A. BURDOCK. (1998) 'Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis)' *Food and Chemical Toxicology* 36 347-63
14. Stefano Castaldo, Francesco Capasso (2002) 'Propolis, an old remedy used in modern medicine' *Fitoterapia* 73 Suppl. 1. S1-S6
15. Antonio Salatinol, ica Weinstein Teixeira, Giuseppina Negril and Dejour Message (2005) Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis *eCAM* 2005;2(1)33-38
16. Rice-Evans CA, Packer L. (1998) Flavonoids in health and disease. Marcel Dekker, New York.
17. 오유진 (1995) 질병을 고치는 프로폴리스요법. 이화문화사
18. 최혁재, 심상범, 김남재, 김종우 (1998) 프로폴리스 물 추출물의 약효연구. *The Journal of Applied Pharmacology* 6, 261-268
19. 권명상, (2002). 프로폴리스의 위염 원인균인 *Helicobacter pylori*에 대한 항균효과. 제4회 자연의학 심포지움. 「프로폴리스의 약리적 규명」
20. 조성기, 오현, 정우희, 정일윤, 이승완, 허용갑, (2003). 천연 프로폴리스를 이용한 유해활성산소 및 산화적 손상 억제 기능성식품개발. 제5회 자연의학 심포지움. 「벌꿀.프로폴리스의 약리활성효과」

21. 진영수, 박은경, 이해영, 강미옥, 이한준, 조성기, 이경옥, (2004). 프로폴리스 섭취가 운동에 의한 산화적 손상에 미치는 영향. 한국체육학회지. 43(3). 753-765
22. 이승완, (2005). 국내 프로폴리스 시장 현황과 연구동향, 한국양봉학회 심포지움 「고품질 양봉산물의 생산과 이용」 81-92
23. 한국과학기술정보연구원 (2005) 무알콜·수용성 프로폴리스 제조공법, . 서울프로폴리스 신기술아이디어사업화 타당성평가사업 최종보고서
24. まつの てつや, (1994). プロポリス - その薬効を探る.
25. Kun-suk Woo, (2004). Use of Venom and Propolis for Apitherapy in Korea, *10th BEENET Symposium and Technofora*.
26. 이수원, 김희재, 황보식, (2001). 국내산 프로폴리스의 화학적 특성에 관한 연구. *KOREA. J. FOOD SCI. ANI. RESOUR.* vol. 21. No. 4, pp. 303-388.
27. 박형기, 김원진, (1997). 우리나라 프로폴리스 생산 현황 및 방법에 대한 연구. *Korean J. Apiculture.* 12. (2) : 97-106.
28. 박형기, (1996). 신비의 물질 프로폴리스의 생산 및 이용현황과 전망. *Korean J. Apiculture.* 11. (2) : 112-119.
29. 한국양봉협회. (2006) 양봉협회보 1-3호
30. 김희재, 황보식, 이수원, (2002). 국산 프로폴리스의 항산화 효과에 관한 연구. *KOREA. J. FOOD SCI. ANI. RESOUR.* vol. 22. No. 1, pp. 77-80.
31. 차용호, 방극승, (2001). 국내에서 수집한 프로폴리스의 품질 특성에 관하여. *Korean J. Apiculture.* 16. (1) : 27-36.
32. 한국과학기술정보연구원, (2005). 신기술 아이디어 사업화 타당성 평가사업 최종보고서. [무알콜·수용성 프로폴리스 제조공법]
33. 농림부 최종보고서, 강원대학교, (1999)
34. Y.M. Choia, D.O. Nohb, S.Y. Choc, H.J. Suhd, K.M. Kimd, J.M. Kim, (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT* 39. 756-761
35. A. Kujumgiev, I. Tsvetkova, Yu. Serkedjieva, V. Bankova*, R. Christov, S. Popov b, (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral

- activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology* 64, 235-240
36. F.A. Santos, E.M.A.F. Bastos, M. Uzeda, M.A.R. Carvalho, L.M. Farias, and E.S.A. Moreira, (1999). Antibacterial Activity of Propolis Produced in Brazil Against *Actinobacillus actinomycescomitans*, *Fusobacterium* spp. and Bacteria from the *Bacteroides fragilis* Group isolated from Human and Marmoset Hosts. *Anaerobe*, 5, 479-481
 37. Lyudmila Boyanova, Sirigan Derejian, Radka Koumanova, Nikolai Katsarov, Galina Gergova, Ivan Mitov, Rossen Nikolov and Zacharii Krastev, (2003). Inhibition of *Helicobacter pylori* growth in vitro by Bulgarian propolis: preliminary report. *Journal of Medical Microbiology*. 52, 417-419
 38. M.C. Marcucci, F. Ferreres, C. Garcia-Viguera, V.S. Bankova, S.L. De Castro, A.P. Dantas, P.H.M. Valente, N. Paulino, (2001) Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*. 74, 105-112
 39. Nada Orsolic, Ivan Basic, (2005). Water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds enhance tumoricidal activity of macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*. 102, 37-45
 40. A. Russoa, V. Cardileb, F. Sanchezc, N. Troncosoc, A. Vanellaa, J.A. Garbarinod. Chilean propolis : antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life Sciences*. 76, 545-558
 41. G. A. BURDOCK, (1998). Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis). *Food and Chemical Toxicology*. 36, 347-363