GA0038- 0967

최 종
보 고 서

Propolis로부터 유용성분의 분리, 정제 및 기능성 식품 개발

Development of health foods using biologically active compounds isolated and purified from crude propolis

연구기관
한 국 식 품 개 발 연 구 원

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “Propolis로부터 유용성분의 분리, 정제 및 기능성 식품 개발” 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

1998. 10. 20

주관연구기관명 : 한국식품개발연구원
총괄연구책임자 : 김 영 언
연 구 원 : 한 대 석
연 구 원 : 이 영 철
연 구 원 : 김 상 희
연 구 원 : 송 효 남
연 구 원 : 박 윤 신

요 약 문

Ⅰ. 제 목

Propolis로부터 유용성분의 분리, 정제 및 기능성 식품 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 중요성

Propolis는 여러가지 수목 및 꽃에서 꿀벌이 모아오는 물질이다. 즉 꿀벌은 수지를 모아서 벌집으로 돌아오는데 이것을 다른 벌이 타액을 묻혀 만들어 내는 것이 바로 propolis이다. Propolis는 현재 암, 당뇨병, 피부질환, 화상, 관절염 및 숙취제거 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며 특히 항바이러스 작용에 대한 관심이 높아지고 있다. Propolis는 수지 및 방향유가 50%, 밀납 30%, 정유 10%, 화분 5%, 기타 성분 5%로 구성되어 있는 복합물질로서 propolis의 주요 화학성분은 flavonoid 화합물로 알려져 있다. Propolis가 식품소재로 이용되기 위해서는 우선 propolis중의 밀납 성분을 제거하여야 하며, 또한 기타 이물질을 제거하여 고순도의 propolis 추출물을 얻는 것이 필요하다. 따라서 propolis로부터 유용성분만을 분리해 낼 수 있는 최적 추출조건 확립이 필요하다. Propolis를 이용한 제품은 국내에서는 거의 생산되지 않고 있는 실정이고 외국의 경우에도 브라질, 호주등 몇몇 국가에서만이 생산을 하고 있으나 최근에 우리나라에서는 이들 제품이 수입되어 고가로 판매되고 있다. 우리나라 국민들의 건강에 관한 관심이 매우 높다는 점을 감안할 때 앞으로 propolis 제품의 수입량은 급속히 증가할 것으로 보인다. 이러한 시점에서 국내에서도 propolis에 관한 관심을 가지고 기초 연구 및 제품개발에 힘을 기울여야 할 것으로 생각되며, 이것은 결국 국내 양봉가와 propolis 제품을 생산하는 중소기업의 수입원을 확보할 수 있도록 하는 것이며 외국산 제품의 수입을 감소시켜 외화 절약에도 큰 몫을 할 것이고 아울러 벌꿀, 화분 등의 소비도 증

가하여 양봉업의 활성화를 꾀할 수 있을 것으로 기대된다.

따라서 본 연구에서는 국내산 propolis의 물리 화학적 특성 및 기능성을 조사함과 동시에 식품 소재화를 위한 유용성분의 최적 추출조건을 확립하고 propolis를 이용한 제품을 개발하였다.

Ⅲ. 연구 개발 내용 및 범위

1. Propolis의 성분분석

본 연구의 시료인 상주산 propolis의 기초자료 수집을 위해 수분, 지질, 단백질, 회분 등의 일반 성분과 무기질 성분을 정량 분석하였다.

2. Propolis 추출물 제조를 위한 최적 추출조건

Propolis를 식품 소재화 또는 제품화하기 위해서는 propolis 자체를 이용하기가 어려우며 propolis 추출물을 제조후 이용하여야 하는데 propolis 중에는 밀납이 다량 함유되어 있어 이를 제거할 필요가 있다. Propolis 추출물을 제조하기 위해서는 우선적으로 추출 용매의 선정이 필요하며, 최적 추출 온도와 추출 시간의 설정 및 propolis와 추출 용매의 비율을 결정하여야 한다. 따라서 propolis 추출물 제조를 위한 최적 조건을 설정하였다.

3. Propolis 추출물 중의 총 페놀 함량 및 flavonoid 함량 분석

페놀화합물은 여러 가지 기능성을 가진 물질로 propolis에도 함유되어 있고 특히 flavonoid는 propolis의 대표적인 기능성 물질이기 때문에 이에 대한 분석을 실시하였다.

4. Propolis 추출물 중의 밀납 제거 방법

Propolis를 이용하는데 있어 가장 중요한 것은 propolis 중에 다량 함유되어 있는 밀납 성분을 제거하는 것이다. 밀납 성분의 제거는 결국 flavonoid와 같은 기능성 물질의 농도를 높이는 효과를 가져오며, 소재화 및 제품 개발시 방해 물질의 제거라는 점에서 중요하다. 그러나 최종적으로는 제품 제조의 원료로 사용되어야 한다는 점에서 화학적 방법은 사용하지 않았고 물리적 방법, 특히 냉동법에 의한 제거 방법을 검토하였다.

5. Propolis 추출물의 유지에 대한 항산화 효과

Propolis 추출물 중에는 flavonoid 성분이 함유되어 있어 유지에 대한 항산화 효과를 나타낼 것으로 판단되나 보고된 자료가 많지 않다. 따라서 국내산과 외국산 propolis 추출물의 유지에 대한 항산화 효과를 몇 가지 방법으로 비교하고 기질에 대한 차이도 검토하였다.

6. Propolis 추출물의 오존에 대한 항산화 효과

오존은 대기오염의 지표 성분으로 반응성이 매우 큰 물질로 체내의 지질 성분 중 불포화 지방산을 산화시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 propolis 추출물이 오존에 의한 생체 산화를 억제할 수 있는지를 인공 생체막에 대해 실험해 보았으며, 이를 위한 오존 반응 장치를 개발하였다.

7. Propolis의 향기성분

Propolis는 독특한 향기를 가진 물질로 산지에 따른 특성을 나타내어 국내산과 외국산을 비교 검토해 보았다.

8. Propolis 추출물을 이용한 제품 개발

Propolis 추출물을 이용하여 음료 제품, 겔 형태의 제품, 타블렛 제품 및 환 제품을 제조하고자 하였다.

Ⅳ. 연구 개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. Propolis의 성분분석

상주산 propolis의 수분 함량은 3.9%, 조지방 함량은 81.1%, 조단백질은 2.5%, 섬유질 4.0%, 회분 1.1%이었고 무기질 함량은 칼슘이 155.5㎎%로 가장 높았고 철분이 21.6㎎%로 가장 낮은 것으로 나타났다.

2. Propolis 추출물 제조를 위한 최적 추출조건

Propolis 추출물 제조를 위한 추출 용매 선정 시험에서 물과 40 99.9% 에탄올을 사용한 결과 70% 에탄올이 가장 효율적인 것으로 나타났고, 추출 온도는 상온 100℃에서 시험해 본 결과 온도에 따른 수율 및 flavonoid 함량 차이가 없어 상온 추출이 적합한 것으로 나타났다. 추출 시간 결정 시험에서는 2 24시간 동안 교반하면서 조사한 결과 6 9시간이 최적 추출 시간인 것으로 나타났다. 또한 propolis에 대한 추출 용매 비율 결정 시험에서는 10배의 용매량이 최적인 것으로 나타났다.

3. Propolis 추출물 중의 총 페놀 함량 및 flavonoid 함량 분석

상주산 propolis의 70% 에탄올 추출물 중의 총 페놀 함량은 약 27%, 물 추출물 중에는 20% 정도가 함유되어 있는 것으로 나타났으며, 상온에서 10배량의

70% 에탄올로 추출한 propolis 추출물 중의 flavonoid 함량은 3.2%로 나타났다. 한편, HPLC로 propolis 추출물을 조사한 결과 flavonoid 성분으로 gallic acid, caffeic acid, ρ-coumaric acid, kaempherol, t-cinnamic acid 및 chrysin 등을 동정하였다.

4. Propolis 추출물중의 밀납 제거 방법

Propolis 추출물에 함유되어 있는 밀납 성분 제거를 위하여 soxhlet법, 열수추출후 냉각법, winterization법, hexane법을 이용하였으며 효율성은 soxhlet법>hexane법>열수추출후 냉각법>winterization법의 순서로 나타났다.

5. Propolis 추출물의 유지에 대한 항산화 효과

대두유에 대한 propolis 추출물의 항산화 효과를 조사하기 위해 상주산, 호주산, 일본산 propolis 추출물을 200, 500, 1000ppm씩 첨가한 후 40℃에서 저장하면서 과산화물가를 측정하였다. 그 결과 항산화 효과는 상주산>호주산>일본산의 순서였으며, 특히 상주산과 호주산의 경우에는 합성 항산화제인 BHA 200ppm 첨가구보다 효과가 우수하였다. 한편, AOM법에 의한 항산화 효과 시험에서는 기질을 대두유와 lard로 하였고 상주산과 원주산 propolis 추출물을 비교하였다. 대두유를 기질로 한 경우에는 상주산과 원주산 사이에 효과의 차이는 거의 없었고, 첨가 농도의 증가에 따라 항산화 효과도 커지는 것으로 나타났으며 항산화제인 토코페롤과 BHA보다 효과가 더 좋았다. Lard를 기질로 한 경우에는 원주산이 상주산보다 효과가 더 좋았다.

6. Propolis 추출물의 오존에 대한 항산화 효과

오존은 오존 발생기에 공기를 공급하면서 일정량의 오존이 지속적으로 공급되도록 장치를 제작하였으며, 이때 발생되는 오존의 농도는 0.018g/ℓ이었다. 오존 산화 반응을 위한 기질로는 liposome을 이용하였으며 상주산, 호주산, 일본산 propolis 추출물을 liposome에 대하여 5%씩 첨가하여 그 효과를 조사한 결과 모두 오존에 대한 항산화 효과를 나타냈으며 효과의 크기는 차이가 없었다.

7. Propolis의 향기성분

Propolis의 향기성분을 포집하기 위해 연속 수증기 증류법에 사용되는 Likens-Nickerson 장치를 이용하였다. 포집된 향기 성분은 GC/MSD로 분석하였고 mass spectrum은 wileynbs library로 확인하였다. 그 결과 주요 peak가 상주산은 22개, 미국산은 15개, 중국산은 12개로 나타났으며 생산지에 따른 구성 성분의 차이를 나타냈다.

8. Propolis 추출물을 이용한 제품 개발

Propolis 추출물을 이용하여 음료 제품, 겔 형태 제품, 타블렛 제품 및 환 제품을 제조하였다. 특히, 음료제품은 2가지를 제조하였는데 각각 음료Ⅰ과 음료Ⅱ로 하였으며 음료Ⅰ은 propolis 추출물, 사과 주스, 당류, 벌꿀 등을 주성분으로 하였고 음료 Ⅱ는 propolis 추출물, 천궁, 벌꿀을 주성분으로 하여 제조하였다. 겔 형태의 제품은 propolis 추출물, 천궁 및 덱스트린을 주성분으로 제조하였다. 타블렛 제품은 propolis 추출물, 효모, 유청칼슘 등을 혼합하여 제조하였으며 환제품은 propolis 추출물, 벌꿀, 현미, 숙지황 등을 혼합하여 제조하였다.

이상과 같은 결과로부터 제조된 각 제품을 참여기업인 상주축산영농조합과 협의하여 제품화를 통한 propolis의 고부가가치 창출을 유도할 필요가 있다.

Summary

Ⅰ. Title

Development of health foods using biologically active compounds isolated and purified from crude propolis

Ⅱ. Object and importance of study

Propolis is a resinous substance collected by bees. It is a highly complex mixture of waxes, resins, balsams, oils and a small amount of pollen. It moistened by bee saliva to be an exudate, that is a natural propolis. The major component of propolis is flavonoids. There are many studies on pharmacological effects of propolis such as antibiotic properties, anti-tumor activity, antiviral and immunostimulant effects, *etc*. To develop health foods from propolis, it is important to isolate flavonoids from crude propolis. Extraction and dewaxing makes propolis into propolis balsam, which is better material for processing. The objectives of this study are to set up optimum extraction temperature, time and organic solvent for propolis extraction, to investigate chemical properties, and to develop health foods from propolis preparation.

Ⅲ. Content and scope of study

1. Analysis of propolis constituents

Moisture content, lipid content, protein content, ash content and mineral content of propolis collected from Sangju were analyzed.

2. Optimum extraction conditions for propolis extract from crude propolis

Optimum extraction temperature, time and organic solvent to prepare propolis extract were set up.

3. Measurement of total phenol contents and identification of flavonoids in propolis extract

Total phenol content was determined, and 15 flavonoids in propolis extract were identified by HPLC.

4. Dewaxing methods for propolis extract

To eliminate wax in propolis extract, winterization, continuous extraction with ethyl ether in soxhlet apparatus, and batch extraction with hexane were compared.

5. Antioxidant effect of propolis extract for edible oils

To study one biological activity, antioxidative effect of propolis extract on edible oil was measured by peroxide value and induction time determined by rancimat method.

6. Inhibition effect of propolis extract for lipid peroxidation by ozone

An apparatus equipped with mass flow controller was designed to control supply of ozone. Oxidation rate induced by ozone was determined by analyzing fatty acid composition of liposomal lipid.

7. Analysis of flavor compounds in propolis extract

Flavor compounds of propolis were collected by simultaneous steam distillation and extraction method. Volatiles of propolis were analyzed by GC/MSD.

8. Development of health foods using propolis extract

Drink, gel-type product and tablet were prepared from propolis extract.

Ⅳ. Suggestion and utilization of results

1. Moisture, lipid, protein, fiber and ash contents of propolis from Sangju were 3.9, 81.1, 2.5, 4.0, 1.1% respectively. Calcium was the most abundant mineral in propolis.

2. When various ethanolic solutions were used, extraction yield was highest in absolute ethanol, whereas flavonoid content was highest in 70% ethanol. Crude lipid in propolis extract increased as the ethanol portion of extraction solvent was increased. Optimum extraction time was 6 9 hours, optimum temperature was around room temperature, and optimum amount of solvent was 10 times of propolis weight, respectively.

3. Total phenol contents in 70% ethanolic solution and aqueous extract of propolis from Sangju were *ca.* 27% and 20%, respectively. Flavonoids in propolis extract were analyzed by HPLC, and gallic acid, caffeic acid, ρ-coumaric acid, kaempherol, t-cinnamic acid, chrysin, *etc.* were identified.

4. Various dewaxing methods were compared in terms of yield and quality of propolis extract. Soxhlet method > hexane extraction method > winterization had dewaxing effect in descending order.

5. Various amount of propolis extracts collected from Sangju in Korea, Australia and Japan were added to soybean oil, and their effects on oxidative stability of the oil were determined by peroxide value. Propolis extracts from Sangju in Korea > Australia > Japan showed antioxidative effect in descending order.

6. Liposomal lipid was oxidized by supplying air(130 ㎖/min) containing ozone(18 ppm) from ozone generator. Oxidation rate was determined by analyzing fatty acid composition of liposomal lipid. When liposomal lipid was oxidized in the presence of ethanolic extracts of propolis from Sangju in Korea, Australia and Japan at 5% of liposomal lipid, all the extracts had antioxidative effect.

7. Among the flavor compounds of propolis from Sangju, America and China collected by simultaneous steam distillation and extraction method, 22, 15, and 12 compounds, respectively, could be identified.

8. Drink, gel-type product and tablet were prepared from propolis extract. Palatable formular of drink I was propolis extract, apple juice, sugars, honey, and palatable formula of drink II was propolis extract, *Cnidium officinale Makino*, and honey. Formular of gel-type product was propolis extract, *Cnidium officinale Makino*, and dextrin. It has new and specific taste. Tablet was formulated from propolis extract, yeast, and calcium lactate

Contents

목 차

제 1 장 서 론

제 1 절 연구 개발의 목적과 범위

1. 연구의 필요성

Propolis는 여러가지 수목 및 꽃에서 꿀벌이 모아오는 물질로 현재 암, 당뇨병, 피부질환, 화상, 관절염 및 숙취제거 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며 특히 항바이러스 작용에 대한 관심이 높아지고 있고 항산화 효과에 대한 보고도 나오고 있다. Propolis는 방향성 발삼(balsam), 밀납(wax) 외에 아미노산, 화분, 철을 비롯한 미량원소, 비타민, 프로비타민, 항균물질, 효소 등을 함유한 복합물질로서 propolis의 주요 화학성분은 flavonoids화합물로 알려져 있다. 현재 국내에서는 벌집에서 propolis를 채취는 하고 있으나 이것을 적절하게 이용은 하지 못하고 있는 실정이며, 최근에 미국산, 호주산 등의 propolis가 수입되어 고가로 판매되고 있다. 우리나라 국민들의 건강에 관한 관심이 매우 높다는 점을 감안할 때 앞으로 propolis 제품의 수입량은 급속히 증가할 것으로 보인다. 이러한 시점에서 국내에서도 propolis에 관한 관심을 가지고 기초 연구 및 제품개발에 힘을 기울여야 할 것으로 생각된다. 먼저 propolis가 식품소재로 이용되기 위해서는 propolis중의 밀납 성분을 제거하여야 하며, 또한 기타 이물질을 제거하여 고순도의 propolis 추출물을 얻는 것이 필요하다. 따라서 propolis로 부터 유용성분만을 분리해 낼 수 있는 최적 추출조건 확립이 필요하다. 다음으로는 지역에 따라 채취된 propolis의 화학성분이 많은 차이를 나타낸다는 점을 고려해 볼때 현재 국내에 수입되고 있는 것과 국내산 벌집으로 부터 채취한 것과는 화학적 특성뿐만 아니라, 기능적 특성에서도 많은 차이가 있을 것으로 판단된다. 따라서 국내산 propolis의 화학적 특성 및 기능성을 조사하고, 식품소재화를 위한 유용성분의 최적 추출조건을 확립함

과 동시에 propolis를 이용한 고부가가치의 다양한 제품 개발이 필요하다고 하겠다. 이것은 결국 국내 양봉가와 propolis 제품을 생산하는 중소기업의 수입원을 확보할 수 있도록 하고, 외국산 제품의 수입을 감소시켜 외화 절약에도 큰 몫을 할 것이며 아울러 벌꿀, 화분 등의 소비도 증가하여 양봉업의 활성화를 꾀할수 있을 것으로 기대된다.

2. 연구 개발의 목적과 범위

가. 연구 개발의 목적

1) 국내산 propolis의 화학적 특성 조사
2) Propolis 추출물 제조를 위한 최적 추출 조건 확립
3) Propolis 추출물의 유지 산화 및 오존 산화에 대한 항산화 효과 조사
4) Propolis의 식품 소재화 기술 개발
5) 제품 형태별 전처리 조건, 부재료 및 배합 비율 설정
6) Propolis 추출물을 이용한 제품 개발

나. 연차별 연구개발 범위

연 도	연구 개발 목표	주 연구 수행 내용
• 1차년도 (1996. 10. - 1997. 10)	Propolis의 화학적, 기능적 특성 및 최적 추출 조건 연구	- Propolis의 성분 분석 - Propolis의 flavonoid 함량 분석 방법 확립 - Propolis 추출물 제조를 위한 최적 추출 조건 설정 - Propolis 추출물의 유지에 대한 항산화 효과 조사 - Propolis의 오존에 대한 항산화 효과 조사
• 2차년도 (1997. 10. - 1998. 10)	Propolis 추출물을 이용한 제품 개발	- Propolis의 식품 소재화 연구 - 제품 형태별 전처리 조건, 부재료 및 배합비 설정 - 음료제품 개발 - 겔 형태 제품 개발 - 타블렛 제품 개발 - 환 제품 개발

제 2 장 Propolis의 화학적 특성 및 최적 추출 조건 분야

제 1 절 서 설

Propolis는 꿀벌들이 꽃봉오리나 나무의 삼출액 등으로부터 채취한 수지물질에 꿀벌의 타액 등을 섞어서 만들어진 수지상 물질로, propolis의 뜻은 그리이스어인 pro(before)와 polis(city)의 합성어이며 꿀벌들이 벌집 입구에 propolis를 이용하여 벽을 쌓는다는 의미에서 유래되었다(1). Propolis를 얻기 위한 가장 중요한 식물원은 포플러, 자작나무, 버드나무, 밤나무, 느릅나무, 소나무, 오크, 가문비나무, 양물푸레나무 등이고, propolis의 주요 구성 성분은 resin, balsam 그리고 phenol 화합물로 알려져 있으며 phenol 화합물의 주된 구성 성분은 flavonoids로 밝혀져 있다(2). Propolis는 온도에 따른 물리적 특성을 나타내는데 15℃에서는 돌처럼 굳고 부서지기 쉽고 30℃정도에서는 부드럽고 유연해지며 100℃ 이상에서는 융해되지만 정확한 융점은 62.5℃로 밀납의 융점이 66℃인 것에 비해 약간 낮으며 비중은 1.127이다. Propolis는 일반적으로 방향성 발삼(balsam), 밀납(wax) 외에 아미노산, 화분, 철을 비롯한 미량원소, 비타민, 프로비타민, 항균물질, 효소 등을 함유하고 있으나, 함량은 생산지역에 따라서 많은 차이를 나타내며 기능성에도 차이를 나타내는 것으로 보고되고 있다(3 5). Bonvehi 등은(2) 지역과 수종이 서로 다른 15종류의 propolis를 분석한 결과 26종의 phenol 화합물을 동정하였고 acacetin과 apigenin이 가장 많은 함량을 차지하고 이밖에도 pinocembrin을 비롯한 quercetin, rutin, vanillin 등이 존재한다고 하였다. 또한 항균 효과에 있어서도 *Bacillus subtilis*와 *Staphylococcus aureus*에 대해서는 tetracycline보다 53배, *Escherichia coli*에 대해서는 약 400배의 높은 항균성을 나타냈다고 보고하였다. Sabatier 등은(6) propolis에서 분리한 pinocembrin(5,7-dihydroxyflavone)이 항균 작용을 나타내는 성분중의 하나임을 보고하였다. 이와 같은 propolis의 여러 가지 기능성은 propolis 중에 함유되어 있는 flavonoids에서 유래되는 것으로 알려져 있다. 일반

적으로 식물체에서 얻은 flavonoids는 당류와 결합된 glycosides의 형태로 존재하는 반면 propolis에 함유되어 있는 flavonoids는 구조상 당류와 결합되어 있지 않은 것으로 알려져 있는데, 이것은 꿀벌이 propolis를 채집하는 과정 중에 타액을 섞게 되며 타액 중의 β-glucosidase가 flavonoid glycosides를 aglicones으로 가수분해하기 때문이고 이를 통해 propolis의 약리학적 특성이 증진된다고 하였다(2). Propolis의 약리 작용에 대한 보고로는 항암 작용(7), 항종양 작용(8), 항보체 활성(9), 보체 활성(10), 간세포 보호 효과(11,12) 등이 있다. 이밖에도 flavonoids의 하나인 pinocembrin의 살균 및 국소 마취 효과, acacetin의 항염증 작용, luteolin과 apigenin의 항궤양 효과, quercetin의 항경련 작용, isoferulic acid의 항균 효과 등이 보고되어 있다(13,14).

이와 같은 많은 기능성을 가진 flavonoids를 함유한 propolis는 훌륭한 가공 식품 재료가 될 수 있음에도 불구하고 우리나라에서의 활용도는 극히 부진한 실정이다. 앞에서 언급한 바와 같이 propolis는 채취 지역에 따라 구성 성분의 차이가 있어 화학적, 기능적 특성이 서로 다를 것으로 생각되나 우리나라에서는 아직 이에 관한 연구가 미진한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 국내산 propolis의 화학적 특성 조사와 함께 propolis의 추출물 제조를 위한 추출 조건에 대해 검토하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 재 료

본 실험에 사용된 propolis는 경상북도 상주에서 채취한 것으로 분쇄 후 이물질을 제거하고 8mesh의 체를 통과시켜 시료로 사용하였다.

2. 방 법

가. 성분 분석

1) 일반성분 분석

Propolis 분말 시료의 일반성분은 AOAC의 표준법(15)에 의거하여 수분은 105℃ 상압가열 건조법, 조지방은 Soxhlet법, 조단백질은 Semimicro Kjeldahl법, 조회분은 건식회화법으로 측정하였으며, carbohydrate는 100%에서 전술한 성분들의 양을 뺀 값으로 나타내었다.

2) 무기질 분석

Propolis 분말시료의 무기질 함량을 AOAC법(16)에 준하여 ICP emission spectroscopy로 정량하였다. 시료를 500℃에서 4시간 건식회화하여 얻은 회분에 10방울의 탈이온수를 첨가하고 4ml의 HNO_3용액(HNO_3 : H_2O=1:1)을 가한 후 hot plate에서 증발, 건고시킨 다음 다시 500℃에서 1시간 동안 회화하고 10ml의 HCl 용액(HCl:H_2O=1:1)에 완전히 용해시켜 50ml로 정용한 후 ICP(Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrophotometer, Jobin Yvon Co., France)로 정량분석하였으며, 이때의 기기조건은 Table 1과 같다.

Table 1. Operating conditions for mineral analysis by ICP

Instrument	Jovin Yvon 138 Ultrace Im Czerny-Turner monochrometer Grating : 2400 grooves/mm
Nebulizer	Glass concentric
Frequency	40.68MHz
Power	1 KW
Cooling gas (Ar)	14 L/min
Aerosol flow rate (Ar)	0.3 L/min
Sheath gas (Ar)	0.3 0.6 L/min
Wave lengths(nm)	
K	766.490
Ca	393.366
Na	588.995
Mg	279.553
Fe	238.204

나. 최적 추출조건

1) 추출 용매

Propolis 분말 15g에 물과 40, 50, 60, 70, 80, 99.9% 농도의 에탄올을 각각 300 ㎖씩 가하여 실온에서 24시간 동안 연속 교반 추출하였다.

2) 추출 온도

최적 농도의 용매를 20배 가하여 실온, 40, 60, 80 및 100℃에서 24시간 동안 연속 교반 추출하였다.

3) 추출 시간

최적 용매로 최적 온도에서 24시간 동안 추출하면서 일정 시간 간격으로 추출액을 취한 후 flavonoid함량을 측정하여 최적 추출 시간을 결정하였다.

4) 추출 용매 비율

용매의 양을 3배, 5배, 10배, 15배 및 20배씩 가하여 최적량을 결정하였다.

다. 총 페놀 함량 및 flavonoid 분석

1) 총 페놀 함량 분석

Propolis 분말의 70% 에탄올 추출물의 총 페놀 함량은 페놀성 성분이 phosphomolibdic acid와 청색반응을 나타내는 Folin-Denis법(17)을 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 시료용액 0.1ml를 증류수 7ml로 희석하고 A.O.A.C.법에 따라 제조한 Folin-Denis reagent를 0.5ml 가하여 잘 혼합하였다. 정확히 3분 후 1ml의 sodium carbonate 포화용액을 가하고 10ml로 정용하여 잘 혼합하여 실온에서 1시간 동안 방치시킨 후 725nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 tannic acid를 이용하여 작성하였다.

2) 총 flavonoid 함량 분석

Propolis의 주요 구성 성분인 페놀성 화합물의 대부분을 차지하는 총 flavonoid의 함량은 식품공전법(18)에 따라 propolis 추출액 50㎕를 시험관에 취하고 에탄올 1.5ml, 10% 질산알루미늄($Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$)용액 0.1ml, 1M-초산칼륨용액(CH_3COOK) 0.1ml, 물 2.8ml를 가하여 충분히 교반을 하였다. 실온에서 40분간 정치 후 액층을 10mm cell을 사용하여 물을 대조액으로 하여 415nm에서 흡광도를 측정하였으며 시료의 흡광도로부터 별도로 상기 조작 중 질산알루미늄용액 대신 물 0.1ml를 가한 것의 흡광도를 뺀 흡광도 차를 시료의 흡광도로 하여 별도로 작성한 검량선에 의거 총 flavonoid 함량을 산출하였다.

3) HPTLC에 의한 flavonoid 성분 분석

Propolis 추출물의 flavonoid 성분을 HPTLC로 분석하였다. RP-18 F254 S TLC plate(10×20cm, 0.25mm, Merck)에 각 추출물 10 20㎕를 점적한 후 1M HOAc in 60% MeOH로 전개하여 UV 254nm에서 확인하였다.

4) HPLC에 의한 flavonoid 성분 분석

Propolis 추출물의 HPLC 분석은 Hypersil ODS guard column(2cm×4.6mm, 5 ㎛; SUPELCO)을 장착한 LiChrosorb RP-18 column(125mm×4mm, 5㎛; Merck, Germany)으로 column oven 온도 35℃에서 분석하였다(19). HPLC system은 JASCO(JASCO Co., Japan) HPLC pump(Model PU-980), column oven(Model CO-965), autoinjector(Model AS-950-10) 및 UV/VIS detector(Model UV-975)로 구성되어 있으며, mobile phase는 water/methanol/acetic acid(60/75/5)의 혼합 용매를 유속 1ml/min의 isocratic flow로 사용하였다. 추출물 시료는 Millex-LCR filter unit(0.5㎛; Millipore Co., USA)를 통과시킨 후 20㎕를 주입하였고 UV 290nm에서 검출하였다.

라. 밀납 제거 방법

1) Soxhlet법

Soxhlet법은 AOAC의 표준법(15)으로 하였다.

2) 열수추출후 냉각법

Propolis 분말 시료에 20배량의 물을 가하여 환류냉각하에 6시간 동안 추출한 후 beaker에 옮겨 24시간 동안 찬물에 방치한 후 상층에 응고된 밀납를 회수하여 양을 측정하였다. 또한 물층에 용출된 밀납의 양을 측정하기 위하여 추출액을 여과후 동결건조하여 soxhlet법으로 측정하였다.

3) Hexane 추출법

Propolis 분말에 20배량의 hexane을 가하여 환류냉각하에 2시간 동안 가열추출한 후 hexane층을 모아 용매를 제거한 후 얻어진 밀납의 양을 측정하였다.

마. 향기 성분 분석

Propolis의 향기성분을 포집하기 위해 연속 수증기 증류법에 사용되는 Likens-Nickerson 장치(J & W Scientific, U.S.A)를 이용하였다. 먼저 증류수 500 ㎖를 1ℓ의 round flask에 넣고 여기에 propolis 50g을 가한 후 n-pentane/diethyl ether 혼합용매 50㎖(2:1, v/v)로 1시간 동안 향기성분을 추출하였다. 추출액에 sodium sulfate anhydrous를 가하여 냉장고에서 24시간 방치하였다. 이렇게 탈수한 추출액을 질소 기류하에서 농축하고 0.6㎕를 취하여 gas chromatograph (Hewlett Packard 5890)로 다음과 같은 조건으로 분석하였다. 즉, capillary column은 Simplicity-1(0.32mm×30m in length, film thickness 0.25㎛, Supelco, U.S.A)을 사용하였고, 이때 injector와 detector의 온도는 250과 260℃이었으며 oven의 온도는 60℃에서 4분간 유지한 후 분당 4℃로 250℃까지 올리고 250℃에서 20분간 유지하였다. Injector port의 압력은 13psi.로 고정하였으며 detector는 FID를 사용하였다. 향기성분의 확인을 위해서 GC/MSD(HP 5973MSD)를 사용하였으며 mass spectrum은 wileynbs library로 확인하였다. GC/MSD의 조작 조건은 Table 2와 같다.

Table 2. GC/MSD operational conditions for flavor analysis

Column	Simplicity-1
Carrier gas	He, 7.6 psi
Oven temperature	60°C(4min) - 4°C/min - 250°C(20min)
Injector temp.	250°C
Thermal aux 2 temp.	280°C
Tune file	Atune. U
Acquisition mode	Scan
Solvent delay	2min
EM voltage	1494.1
Library	Wiley 275.L

제 3 절 결과 및 고찰

1. Propolis의 성분

가. 일반성분

Propolis 분말 시료의 일반성분 분석 결과는 Table 3과 같다. Propolis의 수분 함량은 3.6%로 2.0 2.8%로 보고된 우루과이와 중국의 propolis 보다는 높았다. 조지방 함량은 81.1%로 높은 값을 나타내었는데, propolis 분말의 조지방 함량에 포함된 지질성분들은 propolis의 순수 지질성분인 밀납뿐만 아니라 정유성분(essential oil)이나 레진성분 및 기타 에테르에 쉽게 용출되는 성분들이 함께 추출되었기 때문인 것으로 생각되었다. 이는 상당량의 지질을 이미 제거한 후의 70% 에탄올 추출물의 조지방 함량이 72.7%에 이르는 점으로도 설득력이 있는 것으로 사료되었다. 조단백 함량과 조섬유 함량은 각각 2.5%와 4.0%, 회분함량은 1.1%로 나타났고 현재까지 보고된 propolis의 회분함량은 보통 2 3%이며, 무려 21.5%에 이르는 우루과이산 propolis가 보고된 바 있다.

Table 3. Proximate composition of raw propolis(%)

Sample	Moisture	Crude lipid	Crude protein	Crude fiber	Ash	Carbohy-drate
Sangju	3.9	81.1	2.5	4.0	1.1	7.4

나. 무기질 함량

Propolis 분말시료의 무기질 함량을 분석한 결과는 Table 4와 같다. 무기질의 분석 결과 상주산 propolis는 Ca의 함량이 155.5mg%로 가장 높았고 다음은 K, Mg, Na의 순이었으며 철분은 21.6mg%로 함량이 가장 낮은 것으로 나타났다.

Table 4. Mineral contents of raw propolis **(mg%)**

Sample	Na	K	Ca	Mg	Fe
Sangju	47.9	127.9	155.5	65.2	21.6

2. Propolis 추출물 제조를 위한 최적 추출 조건

가. Propolis 추출물 제조를 위한 용매 선정

식품공전의 propolis 식품의 제조 가공기준인 「추출 용매는 물 또는 주정을 사용하여야 한다」는 항목에 의거 propolis로부터 propolis 추출물을 제조함에 있어 추출 용매로 물과 에탄올을 사용하였다. 최적 용매 농도를 결정하기 위하여 propolis 15g에 물 및 40, 50, 60, 70, 80, 99.9% 농도의 에탄올을 사용하여 실온에서 24시간 연속 교반 추출하여 수율과 flavonoid 함량을 측정하였다.

Propolis를 물로 추출하였을 때는 flavonoid 성분의 추출이 거의 이루어지지 않고 그 수율도 매우 낮았다. 이는 propolis에 함유되어 있는 flavonoid가 난수용성이고 에탄올에 쉽게 용출되기 때문이며 결과적으로 propolis의 물추출은 적합하지 못한 것으로 생각되었다. 일반적으로 propolis의 구성성분은 대부분이 유기용매에 잘 용해되는 것으로 밝혀져 있으나 그 중에서도 에탄올이나 메탄올로 추출하는 것이 가장 효율적인 것으로 알려져 있다.

Table 5. Extraction yield and flavonoids contents of propolis by water and various ethanol concentration

Concentration	Yield (%)	Flavonoids contents (%)	Crude lipids(%)
Water	5.6	0.24	--
40% Ethanol	22.4	1.86	9.3
50% Ethanol	28.8	2.69	17.4
60% Ethanol	39.6	2.96	27.8
70% Ethanol	44.8	3.21	29.9
80% Ethanol	47.6	2.92	31.0
99.9% Ethanol	56.4	2.78	47.2

본 실험에서도 추출수율이 비교적 높고 추출용매로서 안전성이 확보된 에탄올을 용매로 하여 농도별 추출 양상을 조사하였다. Table 5에서와 같이 에탄올의 농도가 높아질수록 추출 수율은 증가하는 경향을 보여 99.9% 에탄올 추출물의 경우에는 50% 에탄올 추출물 보다 약 2배 정도의 수율을 나타냈는데 이것은 에탄올 함량이 높아질수록 propolis에 다량 함유되어 있는 왁스 성분도 함께 추출되어 가용성 고형분의 비율이 높아지기 때문이다. 따라서 propolis 에탄올 추출물의 대량 생산시 탈왁스 공정과 비용을 감안하면 지나치게 높은 농도의 에탄올을 사용하는 것은 비효율적인 것으로 생각되었으며 오히려 추출 수율도 비교적 높고 propolis의 추출 효율이 높은 70% 에탄올을 사용하는 것이 적합할 것으로 사료되었다.

나. Propolis 추출물 제조를 위한 추출온도 및 추출시간 설정

최적 농도인 70% 에탄올로 실온, 40℃, 60℃, 80℃ 및 100℃에서 24시간동안 연속 교반추출하면서 최적 추출온도를 설정하였다. 그 결과는 Table 6과 같다.

Table 6. Extraction yield and flavonoids contents of propolis by various extraction temperature

Temperature	Yield (%)	Flavonoids contents (%)
Room temp.	43.4	2.26
40℃	41.4	2.03
60℃	44.2	2.28
80℃	40.2	1.99
100℃	41.6	2.07

온도에 따른 70% 에탄올 추출물의 추출 수율과 flavonoid 함량은 크게 차이가 나지 않았다. Propolis 중에 함유된 flavonoid는 열에 안정한 물질이므로 고온에서도 파괴되지 않기 때문에 끓는 온도에서 추출하여도 추출량에 큰 차이가 없는 것으로 생각되었다. 따라서 비교적 추출 수율도 높고 flavonoid의 추출도 잘 이루어지는 상온에서 추출하는 것이 실험의 용이성과 비용을 고려할 때 가장 적합한 조건인 것으로 생각되었다. 한편, 최적 추출시간을 설정하기 위해 70% 에탄올로 상온에서 24시간동안 추출하면서 2, 3, 4.5, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 및 24시간별로 추출액을 취하여 각 시간에서의 수율과 flavonoid 함량을 측정하였고 결과는 Table 6과 같다. 24시간 동안 추출하면서 측정한 각 시간대별 추출 수율과 flavonoid 함량 사이에는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 이는 3, 4개월이 소요되는 재래적인 정치 추출방법과는 달리 연속 교반 추출시에는 비교적 단시간내에도 대부분의 유용성분이 추출되는 것으로 나타났다. 따라서 추출 수율과 flavonoid 함량으로 볼 때 6시간에서 9시간 사이가 최적 추출 시간인 것으로 판단되었다.

다. Propolis 추출물 제조를 위한 추출용매의 최적 비율

Propolis에 3, 5, 10, 15, 20배의 70% 에탄올을 가하여 상온에서 6시간 동안 추출하여 수율과 flavonoid 함량을 비교하여 최적 용매량을 결정하였다. 그 결과는 Table 7과 같다.

Table 7. Extraction yield and flavonoids contents of propolis by various amounts of ethanol

Sovent amounts	Yield (%)	Flavonoids contents(%)
3 times	29.5	0.3
5 times	33.2	0.4
10 times	33.7	3.2
15 times	38.9	2.6
20 times	38.5	2.9

Propolis에 대한 용매의 비율이 5배와 10배의 경우에는 수율이 약 33% 정도이고 15배와 20배의 경우에는 약 39%로 약간의 차이를 보였다. 그러나 flavonoid 함량은 용매 비율에 따라 상당한 차이를 나타냈는데 용매량이 10배일 때 가장 많이 추출되는 것으로 나타났다. 용매량이 3배와 5배일 때는 용매의 양이 지나치게 적어 flavonoid 성분이 충분히 추출되지 못하는 것으로 생각되었다. 용매량이 15 20배가 될 경우에는 수율은 높지만 flavonoid 함량은 낮고 추출물 제조 과정에서 용매 비용의 증가와 추출물 제조 후 용매를 제거하는 과정에서의 비용 상승으로 실질적인 생산 공정에서는 적용하기가 어려울 것으로 판단되었다. 따라서 추출 용매 비율은 10배량이 적당할 것으로 생각되었다.

3. Propolis 추출물 중의 총 페놀 함량 및 flavonoid 분석

가. Propolis 추출물 중의 총페놀 함량

Folin-Denis법으로 측정한 총 페놀은 propolis의 주요 구성성분으로 상주산은 20.1% 27.1%로 나타났으며 참고적으로 강원도 원주산의 경우에는 28.2% 28.9%로 나타나 10.1% 28.6%인 외국산 propolis와 비슷한 결과를 나타내었다. 특히 물 추출물에서도 비교적 높은 양이 함유되어 있는 것으로 보아 수용성 페놀성분들도 상당량 존재하는 것으로 생각되었다. 결과는 Table 8과 같다.

Table 8. Total polyphenol content of propolis extract

Extract	Sangju	Wonju
70% Ethanol	21.7%	28.9%
70 Water	20.1%	28.2%

나. Propolis 추출물의 HPTLC(High Performance Thin Layer Chromatography)에 의한 flavonoid 성분 분석

Propolis 추출물의 flavonoid 성분을 HPTLC로 분석하였다. RP-18 F254 S TLC plate(10×20cm, 0.25mm, Merck)에 각 추출물 10 20㎕를 점적한 후 1M HOAc in 60% MeOH로 전개하여 UV 254nm에서 확인하였다. 그 결과 Rf 0.24에서 상주산에서만 특이적으로 254nm에서 밝은 보라색의 spot이 확인되었다. 결과는 Figure 1과 같다.

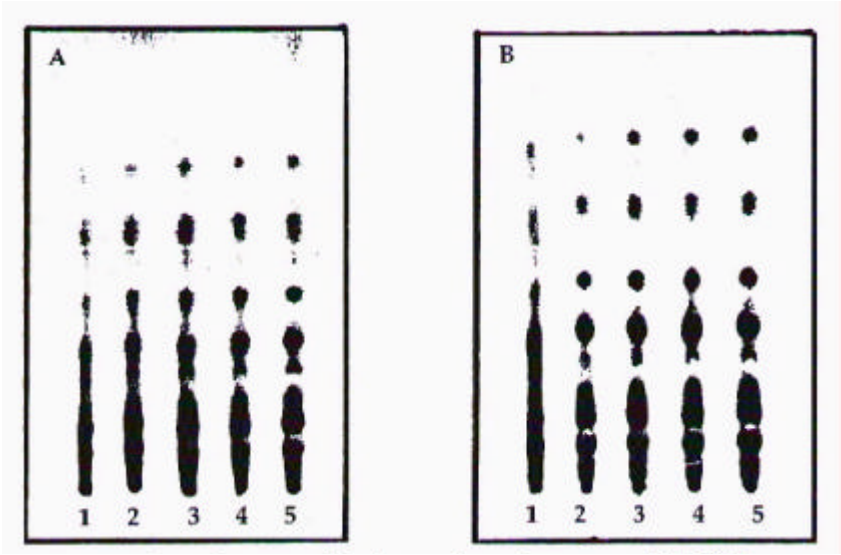

Figure 1. High performance thin layer chromatogram on RP-18 F254 plates observed at 254nm for propolis extract from various organic solvent. Eluent was 1M acetic acid in 60% methanol.

A: Sangju propolis extract B: Wonju propolis extract

1: diethyl ether 2: chloroform 3: ethyl acetate

4: acetone 5: 70% ethanol

다. Propolis 추출물의 HPLC에 의한 flavonoid 성분 분석

상주산 propolis는 16개의 peak가 분석되었으나 이중 표준품으로 확인된 것은 gallic acid(RT 1.46min), caffeic acid(RT 2.16min), ρ-coumaric acid(RT 2.77min), kaempherol(RT 6.81min), t-cinnamic acid(RT 5.58min) 및 chrysin(RT 13.52min) 등 6종류이다. 이 중 가장 많은 양을 차지하는 major peak는 t-cinnamic acid인 것으로 나타났다. 검출된 peak는 Figure 2와 같다. 비교적 많은 연구가 이루어져 있는 유럽산 propolis의 주요 flavonoid는 caffeic acid, ferulic acid와 같은 phenolic acid와 galangin, kaempferol, quercetin(flavonols류), chrysin, apiginin, luteolin, acacetin, tectochrysin(flavones류), pinocembrin, isosakuranetin(flavanones류)등이며, 프랑스산의 경우 galangin과 chrysin이, 불가리아산에는 pinocembrin과 galangin이 주로 함유되어 있는 것으로 보고되어 있다.

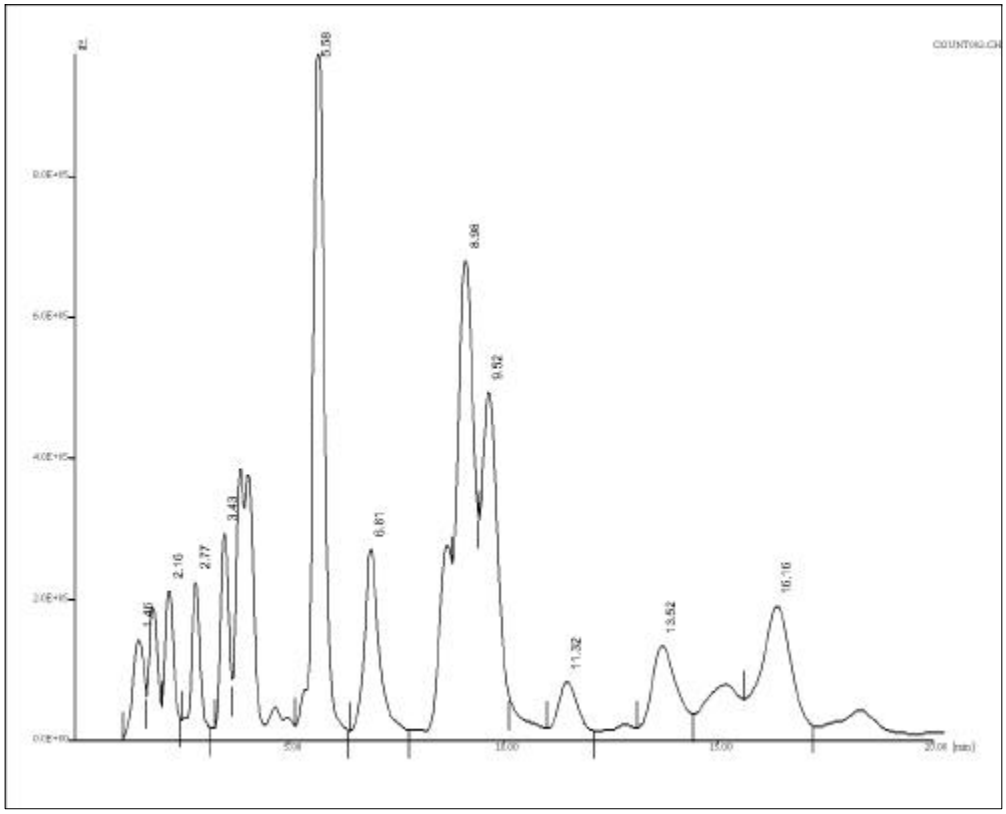

Figure 2. HPLC chromatogram of 70% ethanol extract from Sangju propolis

라. Propolis 추출물 중에 함유되어 있는 밀납 제거 방법

Propolis 추출물을 이용한 제품을 제조하기 위해서는 propolis 추출물의 순도를 높일 필요가 있으며, 가장 중요한 것은 propolis 중에 함유된 밀납 성분의 제거이다. 밀납은 propolis 추출물 제조시 추출용매를 에탄올로 할 경우 용해되어 추출물 중에 혼입되는데 이로 인하여 추출물을 이용한 제품 제조시 방해물질이 된다. 그러나 propolis 추출물을 제조하는데 가장 효과적인 용매는 에탄올이므로 에탄올 추출물 중의 밀납 성분을 제거하기 위한 방법을 모색하였고 냉동 과정을 통한 밀납 성분 제거 방법이 간편성과 함께 산업화를 통한 대량 생산시 효율성을 높일 수 있을 것으로 판단되었다. 방법은 다음과 같다. 즉 먼저 propolis에 각각 10배량

의 70%와 99.9%의 에탄올을 가하여 상온에서 20시간 동안 교반 추출하고, -20℃에서 방치 여과하여 침전물을 제거하였다. 이러한 냉동 및 여과과정을 3회에 걸쳐 실시하였으며, 방치기간은 1회와 2회 때는 48시간, 3회는 24시간으로 하였다. 이 여과액을 감압농축 하여 수율을 조사하였다. 에탄올 추출시 99.9%에서는 propolis의 수율이 34.71%, 70%에서는 29.82%로 99.9%의 에탄올에서 propolis의 수율이 높게 나타났다. 그러나 밀납 성분은 70%보다는 99.9%의 에탄올에서 더 쉽게 용해된다는 점에서 냉동 침전 과정을 거치는 동안 완전히 제거되지 않은 밀납이 일부 용해되어 있을 가능성이 있기 때문에 이 결과만으로 효과적인 면을 결정하기는 어려울 것으로 생각되어 추출물의 물에 대한 분산성을 시험할 필요가 있을 것으로 판단되었다. 먼저, 각 에탄올 추출물을 완전히 농축, 건고한 후 다시 각각의 농도의 에탄올로 농축물의 농도가 10과 20%가 되도록 제조하였다. 이렇게 제조한 propolis 추출물을 상온과 고온의 증류수에 대해 1% 농도로 가한 후 각각의 분산성을 조사하였다. 그 결과 99.9% 에탄올 추출물은 고온의 증류수에서는 분산성이 좋았으나 상온의 증류수에서는 표면에 피막이 형성되는 현상이 나타난 반면 70% 에탄올 추출물은 고온 및 상온의 증류수 모두에서 분산성이 좋게 나타났다. 이러한 특성은 제품 제조시 특히 음료 등을 제조할 때 매우 중요한 요소가 되는데 이는 70% 에탄올 추출물을 직접 제품에 이용할 수 있기 때문이다. 반면 99.9% 에탄올 추출물은 음료 제조시 살균 과정을 거치는 동안은 고온 상태이므로 문제가 없겠으나 냉각 과정 이후 유통단계에서 품질의 변화를 일으킬 수 있기 때문에 직접 이용은 어려울 것으로 판단되었다. 이러한 결과로 볼 때 propolis를 70% 에탄올로 추출하고 이를 3차에 걸친 냉동 공정을 통해 밀납을 제거하는 방법은 propolis 추출물을 이용한 제품 제조를 위한 적절한 방법으로 판단되었다. 참고적으로 위의 실험과는 별도로 propolis 추출물 중의 밀납 성분을 여러 가지 방법을 통해 제거하는 실험을 해 보았다. 이러한 방법들은 실험적으로는 가능하나 실질적인 생산에는 이용할 수 없는 방법들로 soxhlet법, 열수추출후 냉각법, hexane 추출법 등의 4가지 방법을 비교해 보았다. 이러한 3가지 방법에 의한 밀납 제거 효율은 Table 9와 같다.

Table 9. Content of removed wax by the various dewaxing method

Dewaxing method	Removed wax content(%)
Soxhlet method	81.1
Water extraction	32.7
Hexane extraction	55.2

이 실험의 결과를 살펴보면 soxhlet법으로 가장 많은 양의 지질이 추출됨으로써 효과적으로 제거할 수 있을 것처럼 보이나 이 방법으로는 순수한 밀납 성분외에 diethyl ether에 용출되는 다량의 flavonoid가 함께 제거되므로 효율적인 밀납 제거법으로는 적당하지 못하다. 또한 hexane으로 제거시 flavonoid와 같은 propolis의 유용성 성분은 쉽게 제거되지 않으면서(약 1% 미만) 효율적으로 간단한 공정으로 밀납을 제거할 수 있는 가장 좋은 방법이나 diethyl ether와 마찬가지로 식품에 응용할 수 없는 단점이 있다. 한편, 열수추출 후 냉각법은 밀납 제거법으로는 좋은 방법이나 공정이 복잡해져 중소기업 등에서 이용할 경우 propolis 추출물 생산에 많은 설비 투자가 필요할 것으로 판단되었다.

마. Propolis의 향기 성분

상주산, 미국산, 중국산 propolis의 향기성분을 GC/MSD로 분석한 결과 주요 peak가 상주산은 22개, 미국산은 15개, 중국산에서는 12개가 검출되었다. 결과를 살펴보면 지역에 따라 향기성분의 구성성분이 차이가 큰 것을 알 수 있고 retention time 20 30분대에 가장 많은 성분들이 검출되었으며 이것은 3가지 시료 모두 공통적이었다. 향기성분 분석 결과는 Table 10 12와 같다.

Table 10. Flavor compounds of propolis extract from Sangju

No	RT	Library
1	3.511	benzene
2	4.452	nonane
3	5.133	benzaldehyde
4	6.770	n-octanal
5	7.513	bezenemethanol
6	10.297	nonanal
7	11.777	cycloprop[a]indene
8	13.929	decylaldehyde
9	14.060	β-cyclocitral
10	16.547	2-propen-1-ol
11	20.644	tridecanal
12	21.152	β-caryophyllene
13	23.706	BHT
14	26.960	calarene
15	27.086	γ-eudesmol
16	27.481	β-eudesmol
17	27.644	α-eudesmol
18	34.557	farnesyl acetone C
19	39.725	heneicosane
20	48.313	tricosane
21	47.753	pentacosane
22	51.416	heptacosane

Table 11. Flavor compounds of propolis extract from USA

No	RT	Library
1	7.512	benzenemethanol
2	10.133	benzeneethanol
3	13.495	benzoic acid
4	16.650	2- propen- 1- ol
5	26.221	guaiol
6	26.970	calarene
7	27.105	γ - eudesmol
8	27.507	β - eudesmol
9	27.661	α - eudesmol
10	36.736	hexadecanoic acid
11	45.348	4H- 1- benzopyran- 4- one
12	47.761	pentacosane
13	51.437	heptacosane
14	55.632	eicosane
15	70.532	17- pentatriacontene

Table 12. Flavor compounds of propolis extract from China

No	RT	Library
1	7.520	benzyl alcohol
2	10.136	benzeneethanol
3	13.550	benzoic acid
4	15.139	2- propenal
5	16.645	2- propen- 1- ol
6	26.226	guaiol
7	26.977	calarene
8	27.107	γ - eudesmol
9	27.540	β - eudesmol
10	27.683	α - eudesmol
11	29.990	benzyl benzoate
12	51.421	heptacosane

제 4 절 참고문헌

1. MediHerb Newsletter : A natural antibiotic. MediHerb Pty LtD, Dec. (1988)
2. Bonvehi, J.S., Coll, F.V. and Jorda, R.E.: The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. *JAOCS*, 71(5), 529-532 (1994)
3. Ghisalberti, E.L. : Propolis : A Review. *Bee World*, 60(2), 59-84 (1979)
4. **박호용, 오현우, 박두상, 장영덕** : **한국산 봉교 추출물의 항생활성**. ***한국양봉학회지***, 10(1), 53-56 (1995)
5. Monti, M., Berti, E., Carminati, G. and Cusini, M. : Occupational and cosmetic dermatitis from propolis. *Contact Dermatitis*, 9, 163-164 (1983)
6. Sabatier, S., Amiot, M.J., Tacchini, M. and Aubert, S. : Identification of flavonoids in sunflower honey, *J. Food Sci.*, 57(3), 773-777 (1992)
7. **松野哲也** : **プロポリスに含まれる生理活性物質**. *Honeybee Science*, 13(2),49-54 (1992)
8. Krochmal, C. : Anti-tumor activities of hive products. *Am. Bee J.*, 134(6), 420 (1994)
9. Ivanovsca, N.D., Dimov, V.D., Pavlova, S., Bankova, V.S. and Popov, S.S. : Immunomodulatory action of propolis. **V**. Anticomplementary activity of a water-soluble derivative. *J. of Ethnopharmacology*, 47, 135-143 (1995)
10. Ivanovsca, N.D., Dimov, V.D., Pavlova, S., Bankova, V.S. and Popov, S.S. : Immunomodulatory action of propolis. **VI**. Influence of a water soluble derivative on complement activity in vivo. *J. of Ethnopharmacology*, 47, 145-147 (1995)

11. Gonzalez, R., Remirez, D., Rodriguez, S., Gonzalez, A., Ancheta, O., Merino, N.and Pascual C. : Hepatoprotective effects of propolis extract on paracetamol-induced liver damage in mice. *Phytotheraphy Research*, 8, 229-232 (1994)

12. Gonzalez, R., Corcho, I., Remirez, D., Rodriguez, S., Ancheta, O., Merino, N., Gonzalez, A. and Pascual C. : Hepatoprotective effects of propolis extract on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *Phytotheraphy Research*, 9, 114-117 (1995)

13. Bankova, V.S., Popov, S.S. and Marekov, N.L. : A study on flavonoids of propolis, *J. Natural Prod.*, 46(4), 471-474 (1983)

14. Chi, H., Hsieh, A.K., Ng, C.L., Lee, H.K. and Li, S.F.Y. ; Determination of components in propolis by capillary electrophoresis and photodiode array detection, *J. Chromatography* , 680, 593-597 (1994)

15. A.O.A.C. : Official Methods of Analysis, 14th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C., 1984

16. A.O.A.C. : Official Methods of Analysis, 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C., 1990

17. Swain T, and Jillis W.E. : The phenolic constituent of prunus domestica **I** :The quantitative analysis of phenolic constituents. *J cf Food Science and Agriculture*, 10, 63 68 (1959)

18. **보건복지부**: **식품공전**, **한국식품공업협회**, 1997

19. Strack, D. and Krause, J. : Reversed-phase high performance liquid chromatographic separation of naturally occuring mixtures of flavone derivatives. *J cf Chromatography*, 156, 359 361 (1978)

제 3 장 Propolis의 항산화 효과 분야

제 1절 서 설

유지의 산패를 방지하기 위한 많은 노력이 이루어지고 있다. 최근에는 지금까지 가장 널리 사용되어온 BHA, BHT 등의 합성 항산화제를 대체할 수 있는 천연항산화제에 대한 관심이 어느때보다 높은 것이 사실이다. 1954년과 1956년에 BHA와 BHT가 개발된 이래로 지금까지 많은 합성 항산화제가 개발되어 왔지만 그 안전성에 대해서는 아직도 논란이 있는 실정이다(1). 따라서 안전성과 효과가 뛰어난 천연항산화제 개발을 위한 많은 연구가 이루어지고 있는 가운데 특히 많은 관심을 끌고 있는 것이 향신료 분야이다. 향신료는 항균작용 뿐만아니라 항산화작용도 나타내는데(2, 3) 특히 향신료의 정유성분에서(4, 5)항산화효과를 볼 수 있으며, 향신료외에도 색소물질인 anthocyanin(6)과 carotenoid(7)도 항산화작용이 있는 것으로 보고되고 있다. 이밖에도 참깨(8), 아보카도(9), 양파류(10) 등의 항산화효과에 대해서도 보고되어 있다. 이와같이 효과가 있는 항산화제를 함유한 천연식물이 많음에도 불구하고 아직 대표적 천연항산화제인 토코페롤을 대체할 수 있는 항산화물질은 발견되지 않고 있다.

한편, 최근에 대기오염이 심각한 사회문제로 대두되면서 많은 관심이 모아지고 있다. 대기오염 물질 중 관심을 가져야 할 물질로는 오존이 대표적이며 유독한 물질로 알려져 있다. 오존은 대기오염의 지표성분으로 유해가스의 일종이며 -78℃에서도 olefin과 빠른 속도로 반응을 일으키는 반응성이 매우 큰 가스이다. 비록 오존은 그 자체가 free radical이 아니지만 유기물질과 반응하여 쉽게 라디칼을 형성할 수 있으며, 공기중에 일정량 이상의 오존이 함유되어 있을 경우 폐지질 성분 중 불포화 성분 중 불포화지방산의 산화를 급속히 진행시켜 포유동물이 호흡 후 분출하는 가스에는 펜탄과 에탄이 다량 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 자유라디칼에 의해 인체가 노화되거나 죽음에 이른다면 역으로 이들 물질에 노출되는

기회를 최소화하거나 이들의 반응성을 억제한다면 수명을 연장시킬 수 있고 라디칼이 관여하는 질병을 예방하므로써 건강을 양호하게 유지시킬 수 있다는 추론이 가능하며 실제로 이런 점에 착안하여 초파리를 이용한 연구가 이루어지고 있다.(11) 최근에는 식품을 이용하여 이러한 문제를 해결하려는 시도가 이루어지고 있다. 즉, 식품 성분 중에는 인체 내에서의 산화반응을 억제할 수 있는 물질이 있으며 특히 식물체에 라디칼의 반응성을 억제할 수 있는 물질이 여러가지 알려져 있어 이에 관한 연구가 활발하며 일부는 상품화 되고 있다(12). 그런데 유지의 예에서 알 수 있듯이 어느 산화방지제가 모든 종류의 유지류에 같은 산화방지 효과를 나타내지는 못하듯이 특정 물질이 생체의 산화반응 또는 라디칼의 반응 전반에 걸쳐 반응성을 억제하지는 못한다고 판단된다. 따라서 활성산소의 종류나 라디칼 source에 따라 또한 반응기작에 따라 각각이 일으키는 반응성을 억제할 수 있는 물질의 발굴에 관한 연구가 필요하다고 생각된다. 일본의 M.D. Niwa(13)와 한 등(14,15)은 superoxide의 반응성을 억제할 수 있는 물질을 탐색하고 이를 이용한 식품을 개발한 바 있으며, Chimi 등(16)의 peroxyl 및 hydroxyl radical scavenger에 관한 연구를 비롯하여 이 분야의 연구가 진행되고 있다.

Propolis는 항산화 작용을 나타내는데 이것은 peroxy radical에 대한 flavonoid의 scavenging 효과에 의한 것으로 알려져 있으며(17) Yamauchi 등은(18) propolis로부터 분리한 benzyl caffeate가 항산화 효과를 나타내는 물질이라 하였다. 또한 임 등은(19) propolis 메탄올 추출물이 항산화 효과를 보였다고 보고하였다. 이와 같이 propolis의 항산화 효과에 대한 일부 보고는 있으나 오존 산화에 대한 연구는 국내외적으로 미진한 상황이다. 따라서 propolis 추출물의 항산화제로의 이용을 위한 기초 연구로서 식용 유지에 대한 항산화 효과와 오존 산화에 대한 항산화 효과를 검토하였다.

제 2절 재료 및 방법

1. 유지에 대한 항산화 효과 측정 방법

가. 과산화물가

일정량의 대두유에 산지별 propolis를 각각 200, 500, 1000ppm 씩 첨가한 뒤 40℃에서 저장하면서 과산화물가(POV)를 측정하였고(20), 이때 산지별 propolis는 상주산 propolis의 경우 경북 상주에서 직접 구매하여 이를 70% 에탄올로 추출하고 여과한 후 왁스를 제거하기 위하여 -20℃에서 24시간 방치하였으며 이것을 여과지로 여과한 후 40℃에서 감압 농축하여 시료로 하였다. 호주산과 일본산 propolis 추출물은 기존의 상품을 구입하여 이를 40℃에서 감압농축하여 시료로 하였다. 한편, propolis 추출물의 항산화 효과를 비교하기 위하여 BHA 200ppm 첨가구도 함께 저장하면서 과산화물가를 측정하였다.

나. Rancimat법

Propolis 추출물의 항산화 효과를 조사하기 위해 Rancimat법(21)을 이용하였다. 먼저 propolis의 70% 에탄올 추출물을 oil에 완전히 분산시키기 위하여 AOT(dioctyl sodium sulfosuccinate; Aerosol OT) 역미셀을 제조하였고 추출물에 함유된 물은 역미셀내에 효과적으로 용해되어 외관상으로도 혼탁하지 않고 투명하며, 열역학적으로도 매우 안정한 water in oil system의 미세한 에멀젼 용액을 형성하였다. Oil에 AOT 0.1M을 넣고 10분간 교반한 후 일정농도의 propolis 추출물을 첨가하여 5분간 교반하고 감압농축기로 5분간 증발시켜 역미셀 시료로 사용하였다. Propolis 추출물의 항산화 활성은 Rancimat 679(Metrohm, Swiss)로 대두유와 lard에 대해 측정하였으며, conductivity가 급격하게 증가되는 시점까지를 유도기간으로 계산하여 항산화력을 측정하였다. 유지 4g에 propolis 추출물을 200, 500, 및 1,000ppm의 농도로 역미셀을 만들어 반응온도 98℃, air flow rate 20liter/hr의 기기 조건에서 induction time을 측정하였고, 천연항산화제인

tocopherol과 합성항산화제인 BHA의 첨가구와 함께 산화안정성을 비교하였으며 각 항산화제를 첨가한 처리의 유도기간을 무첨가구의 유도기간으로 나눈값을 antioxidant index(AI)로 구하였다.

2. 오존에 대한 항산화 효과 측정 방법

Propolis 추출물은 유지에 대한 항산화 효과 실험에서와 같은 방법으로 제조하였다. 오존 산화 반응의 기질은 liposome을 이용하였는데 순도 40% PC (phosphatidylcholine)를 column chromatography를 통하여 순도 95% PC로 정제하였으며 이를 사용하여 liposome을 제조하였다. 오존은 오존발생기에 산소를 공급하면서 일정량의 오존이 지속적으로 공급되도록 장치를 제작하였으며(Figure 3) 이때 발생되는 오존의 농도는 0.018g/ℓ이었다. 오존 산화 반응은 PC에 대하여 propolis 추출물이 5%가 되도록 가하고 25℃에서 10분간 오존을 공급하면서 산화반응이 일어나도록 하였다. 산화반응이 끝난 후 반응계로부터 지방질만을 추출한 후 methylation 시키고 gas chromatography로 지방산 조성을 분석하였으며 분석조건은 injector 온도 250℃, detector 온도 260℃, detector는 FID이었으며 사용한 column은 supelco wax 10 capillary column(length 30m, ID 0.32mm, film thickness 0.25㎛)이었다. 이때 internal standard는 heptadecanoic acid methyl ester를 사용하여 지방산을 정량하였다. 이 실험 결과 기질인 liposome을 구성하는 지방산중 가장 많은 함량을 차지하는 linoleic acid가 오존 산화반응에 의하여 그 함량 변화가 가장 크게 일어나는 것으로 나타나 linoleic acid의 변화를 오존 산화반응에 대한 항산화효과의 기준으로 하였다.

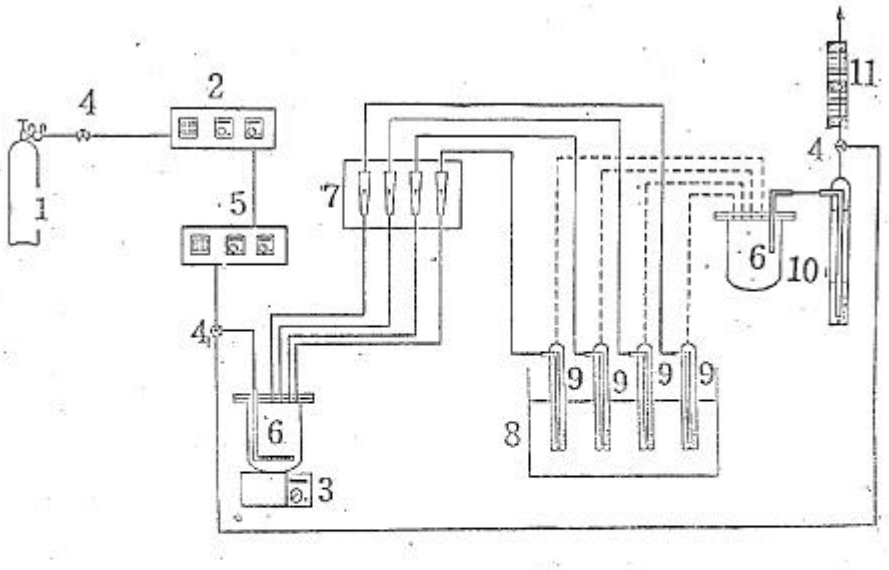

Figure 3. An equipment used for the oxidation ofliposome with ozone

1. Oxygen
2. Mass flow controller
3. Mixer
4. 3-way valve
5. Ozone generator
6. Buffer chamber
7. Rotameter
8. Water bath
9. Reaction vessel
10. Neutralization vessel
11. Ozone catalyst

제 3 절 결과 및 고찰

1. Propolis 추출물의 유지에 대한 항산화 효과

Propolis의 기능성 중의 한가지로 알려져 있는 항산화 효과를 살펴보기 위해 산지별 propolis 추출물의 식용유지에 대한 항산화 효과를 조사하였다. 이는 propolis의 산지에 따라 항산화 효과의 차이가 있다는 외국 문헌의 보고가 있어 이를 확인하고 국내산 propolis의 항산화 효과를 검증하기 위해 실시하였다. 먼저 이 실험의 결과는 Table 13과 같다. 상주산과 호주산 propolis 추출물 첨가구는 합성항산화제인 BHA 첨가구보다도 높은 항산화 효과를 나타내었다. 특히 상주산 propolis 추출물은 가장 효과가 큰 것으로 나타나 천연 항산화제로의 이용이 가능할 것으로 생각되었다. 반면, 일본산의 경우 대조구와 별 차이를 보이지 않아 효과가 거의 없는 것으로 나타났다. 한편, 첨가농도에 따른 항산화 효과를 보면 상주산과 호주산의 경우 첨가한 propolis의 농도가 높을수록 항산화효과는 큰 것으로 나타났다. 첨가농도의 증가에 따른 항산화효과 증가폭은 상주산이 호주산에 비해 더 컸다. 반면, 일본산의 경우 항산화효과가 첨가 농도에 따른 일정한 경향을 보이지 않았다. 즉, 대두유에 대한 산지별 propolis의 항산화효과는 상주산 > 호주산 > 일본산이며, 그 효과는 상주산 및 호주산에서는 첨가농도가 높을수록 증가하였으며 일본산은 일정한 경향을 나타내지 않았다. 결과는 Figure 4 6과 같다.

Table 13. Antioxidant effect of propolis extract from various origin for soybean oil (POV : meq/kg oil)

Storage time (days) / ppm		0	15	25	35	39	43	47
Control	0	1.0	2.9	3.1	38.4	62.8	86.1	117.5
BHA	200	-	1.9	3.1	32.5	55.6	80.7	99.8
상주	200	-	1.9	3.4	6.8	12.0	24.9	37.7
	500	-	1.5	3.6	4.1	4.5	6.4	8.4
	1000	-	1.3	2.41	3.1	3.9	4.8	5.7
호주	200	-	1.7	2.8	14.2	26.5	35.5	44.6
	500	-	1.6	2.6	7.9	11.2	17.4	23.6
	1000	-	1.4	1.9	5.9	8.1	12.0	15.9
일본	200	-	2.2	9.0	40.2	57.9	71.6	93.0
	500	-	3.5	19.9	49.8	58.3	76.9	95.2
	1000	-	4.1	18.0	43.3	55.6	71.6	84.4

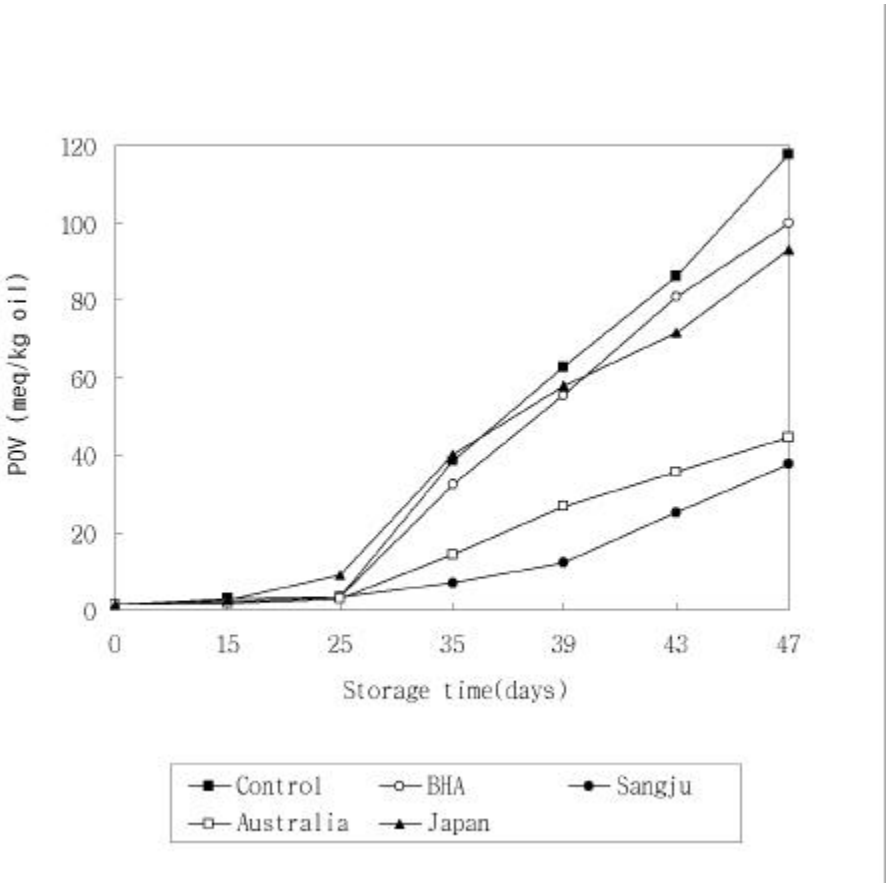

Figure 4. Antioxidant effect of propolis extract at 200 ppm concentration for soybean oil

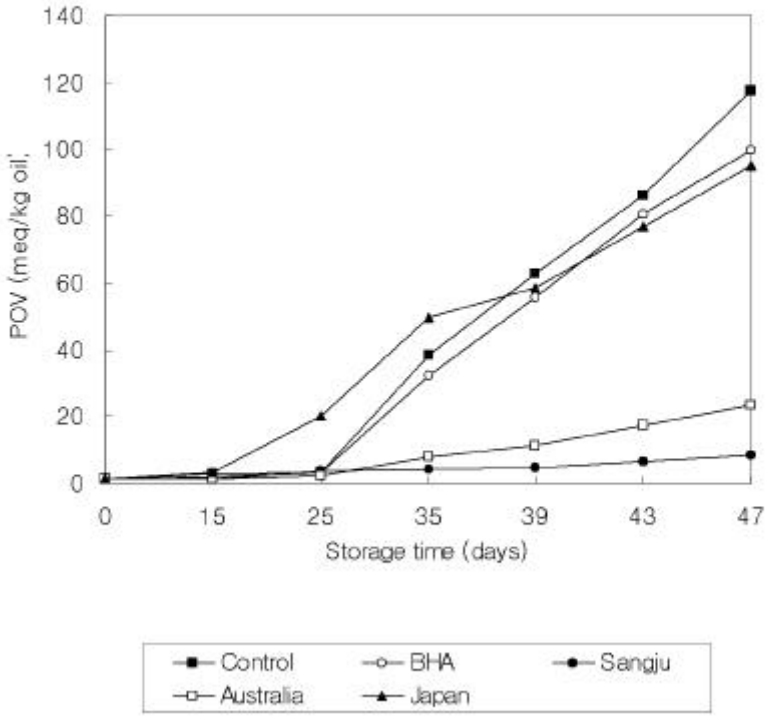

Figure 5. Antioxidant effect of propolis extract at 500 ppm concentration for soybean oil

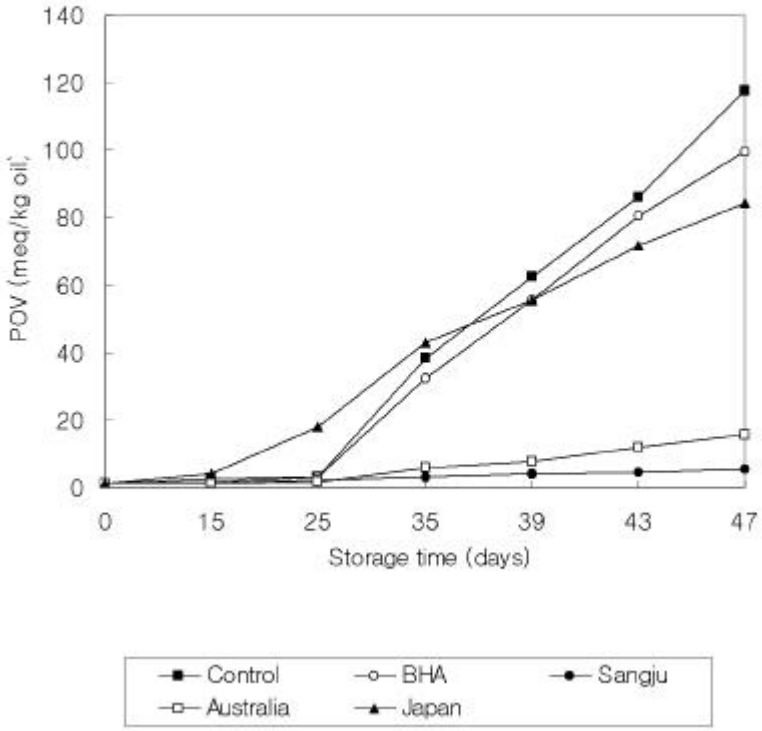

Figure 6. Antioxidant effect of propolis extract at 1000 ppm concentration for soybean oil

한편, propolis 추출물의 항산화 효과를 Rancimat법으로 측정하였으며 기질은 대두유와 lard를 사용하였다. 먼저 propolis의 70% 에탄올 추출물을 oil에 완전히 분산시키기 위하여 AOT(dioctyl sodium sulfosuccinate; Aerosol OT) 역미셀을 제조하였고 추출물에 함유된 물은 역미셀내에 효과적으로 용해되어 외관상으로도 혼탁하지 않고 투명하며, 열역학적으로도 매우 안정한 water in oil system의 미세한 에멀젼 용액을 형성하였다. Oil에 AOT 0.1M을 넣고 10분간 교반한 후 일정농도의 propolis 추출물을 첨가하여 5분간 교반하고 감압농축기로 5분간 증발시켜 역미셀 시료로 사용하였다. Propolis 추출물의 항산화 활성은 Rancimat 679(Metrohm, Swiss)로 대두유와 lard에 대해 측정하였으며, conductivity가 급격하게 증가되는 시점까지를 유도기간으로 계산하여 항산화력을 측정하였다. 유지 4g에 propolis 추출물을 200, 500, 및 1,000ppm의 농도로 역미셀을 만들어 반응온도 98℃, air flow rate 20liter/hr의 기기 조건에서 induction time을 측정하였고, 천연항산화제인 tocopherol과 합성항산화제인 BHA의 첨가구와 함께 산화안정성을 비교하였으며 각 항산화제를 첨가한 처리구의 유도기간을 무첨가구의 유도기간으로 나눈값을 antioxidant index(AI)로 구하였다. Rancimat 679로 측정한 propolis 추출물의 항산화 활성을 Figure 7과 8에 나타내었다. 먼저 Figure 7은 propolis 추출물의 첨가 농도에 따른 유지에 대한 항산화 효과를 나타내었는데 첨가량이 증가함에 따라 그 효과도 커지는 것을 알 수 있다. 또한, 대두유보다는 oleic acid가 주요 지방산을 구성하는 lard에 대하여 그 효과가 뛰어남을 알 수 있다. Figure 8은 상주산과 원주산 propolis 추출물의 항산화 효과를 비교한 것으로 대두유의 경우 상주산과 원주산사이의 항산화력 차이는 거의 없었고, tocopherol과 BHA보다 활성이 높아 적은 양으로도 합성 항산화제보다 우수한 효과를 볼 수 있을 것으로 생각되었다. Lard의 경우 농도에 따라 원주산이 상주산보다 항산화 효과가 더 높았고 200ppm 첨가구에서는 tocopherol과 BHA보다는 활성이 낮아 lard에 propolis 추출물을 활용하기 위해서는 이들보다 많은 양을 사용하여야 기대하는 효과를 얻을 수 있을 것으로 생각되었다.

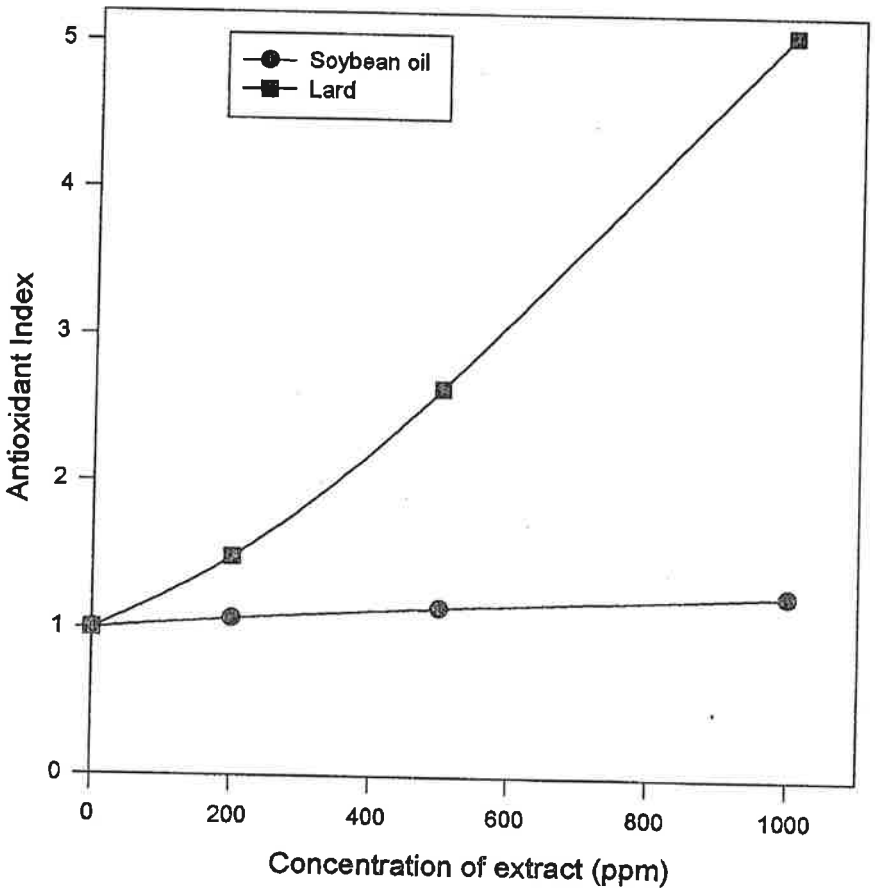

Figure 7. Antioxidant effect of propolis extract from Sangju for soybean oil and lard determined by Rancimat and AI (antioxidant index) was calculated as follows; AI=induction time of sample/induction time of control

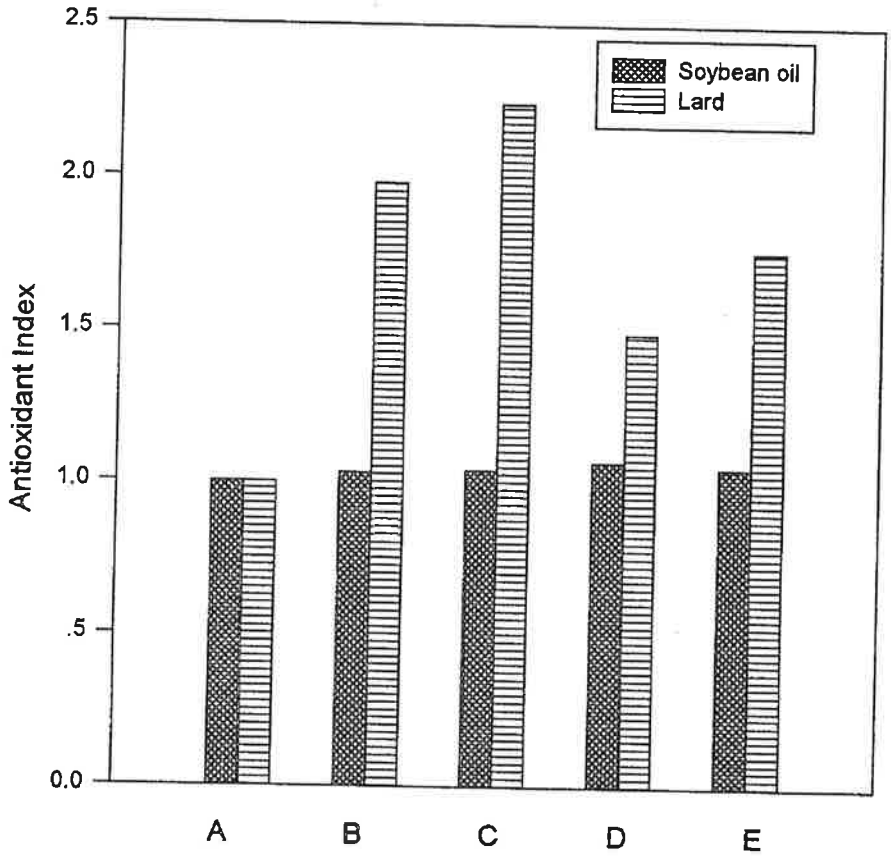

Figure 8. Antioxidant effect of the propolis extract for soybean oil and lard at the 200ppm determined by Rancimat 679; A: control, B:tocopherol, C: BHA, D: sangju propolis, E: wonju propolis

2. Propolis 추출물의 오존에 대한 항산화 효과

Propolis의 유지에 대한 항산화 효과는 일부 보고 자료가 있으나 오존에 대한 항산화 효과는 보고된 바 없다. 오존은 대기오염의 지표성분으로 반응성이 매우 크며 오존 자체가 라디칼은 아니지만 유기물질과 반응하여 쉽게 라디칼을 형성할 수 있고 공기중에 일정량 이상의 오존이 함유되어 있을 경우 폐지질 성분인 불포화 지방산을 급속히 산화시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 propolis가 유해물질인 오존에 의한 산화를 억제할 수 있는지를 실험해 보았다. 먼저 propolis 추출물을 첨가하지 않은 경우 산화반응 전 linoleic acid 함량은 PC 100㎎당 63.1㎎이었고 반응후에는 20.7㎎으로 감소하였다. 반면 일본산 propolis 추출물을 첨가한 경우에는 반응 후 26.6㎎, 상주산은 25.6㎎, 호주산은 25.6㎎으로 나타나 propolis 추출물을 첨가한 경우 약간의 차이는 있으나 생산국에 관계없이 오존에 대한 항산화 효과를 나타내었다. 이 결과는 유지에 대한 항산화 효과와는 다른 양상을 보였는데 반응 기질의 차이에서 유래되는 것으로 판단되었다.

제 4절 참고문헌

1. **神田豊輝, 中鳥智恭**: **ハーブ系スパイスからの天然抗酸化劑について**, *New Food Industry* , **23**(2), 36(1981)
2. Pruth, J.S. : Spices and Condiments, Academic Press, p18(1980)
3. **春日敦子, 靑柳康夫, 菅原龍幸 : 食用植物の抗酸化性について**, ***日本食品工業學會誌***, **35** (12), 828(1988)
4. Farag, R.S., Badei, A.Z.M.A., Hewedi, F.M. and E1-Baroty, G.S.A.: Antioxidant activity of some spice essential oils on linoleic acid oxidation in aqueous media, *JAOCS*, **66**(6), 792(1989)
5. Farag, R.S., Badei, A.Z.M.A. and E1-Baroty, G.A.S. : Influence of thyme and clove essential oils on cottonsed oil oxidation, *JAOCS*, **66**(6), 800(1989)
6. Igarashi, K., Takanashi, K., Makino, M. and Yasui, T. : Antioxidative activity of majir anthocyanin isolated from wild grapes, ***日本食品工業學會誌***, **36**(10) 852(1989)
7. Burton, G.W. : Antioxidant action of carotenoids, *J. Nutrition*, **119**, 109(1989)
8. **福田靖子 : ゴマ種子の抗酸化性分に關する食品化學的硏究**, ***日本食品工業學會誌***, **37**(6), 484(1990)
9. **能勢征子, 膝野直子 : 植物性食品の抗酸化能及びアボカド果皮の抗酸化性物質**, ***日本食品工業學會誌***, **29**(9), 507(1982)
10. **內膝茂三, 山口直彦, 橫尾良夫 : ネギ類植物からの抗酸化物質の檢索**, ***日本食品工業學會誌***, **28**(6), 291(1981)
11. Orr, W.C. and Sohal R.S.: Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in Drosophila melanogaster. *Science*, 263, 1128 (1994)
12. Ramarathnam, N., Osawa, T., Ochi, H., and Kawakishi, S.: The contribution

of plant food antioxidants to human health. *Trend. Food Sci. Technol.*, 75 (1995)

13. Niwa, Y.: Investigation on the drug delivery (DDS) in natural medicinal or health products-clinical effectiveness and inhibitory effect on lipid peroxidation of SOD-like health products and cancer retardant effect of natural product, BG-104. *Pharm. Tech. Japan*, 3, 1067 (1987)
14. Kim, S.J., Han, D., Park, M.H., and Rhee, J.S.: Screening for superoxide dismutase-like compounds and its activators in extracts of fruits and vegetables. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58(12), 2263 (1994)
15. **한대석, 김석중: 국산 과채류의 수요확대를 위한 다양한 가공제품의 개발 (3차년도). 한국식품 개발연구원 보고서**, E1271-0519 (1994)
16. Chimi, H., Cillard, J., Cillard, P., and Rahmani, M.: Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *JAOCS*, 68(5), 307 (1991)
17. Scheller, S., Wilczok, T., Imielski, S., Krol, W., Gabrys, J. and Shani, J. : Free radical scavenging by ethanol extract of propolis, *Int. J. Radiat. Biol.*, 57(3), 461-465 (1990)
18. Yamauchi, R., Kato, K., Oida, S., Kaneda, J. and Ueno, Y. : Benzyl caffeate, an antioxidative compound isolated from propolis. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56(8), 1321-1322 (1992)
19. **임대관, 최 웅, 신동화, 정용섭** : Propolis **추출물의 유지 산화 억제 효과**. ***한국식품과학회지***, 26(5), 622-626 (1994)
20. A.O.C.S. Official method Ce 8-53, 4th ed., American Oil Chemists' Society (1990)
21. Laubli, M.W. and Bruttel, P.A. : Determination of the oxidative stability of fats and oils : Comparison between the active oxygen method(AOCS Cd 12-57) and the rancimat method. *JAOCS*, 63(6), 792-795 (1986)

제 4 장 Propolis 제품 개발 분야

제 1 절 서 설

Propolis는 다양한 기능성을 가진 소재이긴 하나 국내에서는 식품으로의 이용이 미진하며, propolis 추출물을 식품 첨가제로 활용한 보고가 있는 정도이다(1). 외국에서는 propolis를 냉동육의 지방 산패를 억제하기 위한 항산화제로 이용한 보고(2)외에 화장품, 치약 , 일광 차단제 등의 재료 및 첨가제로 사용하고 있어(3) 우리나라와는 달리 그 활용도가 다양하다. 우리나라에서는 1995년에 propolis 식품이 식품공전에(4) 등재되어 건강보조식품으로 사용할 수 있도록 허가되었다. 그러나 식품공전상의 건강보조식품이 되기 위해서는 제품의 형태가 캡슐이나 정제 등이 될 수 밖에 없어 제품의 다양화를 이루기가 어려운 문제가 있다. 따라서 propolis 추출물을 첨가물로 이용하여 건강보조식품이 아닌 기타식품으로의 개발도 필요할 것으로 생각 되었다. 본 연구에서는 propolis를 이용한 다양한 제품의 개발을 위해 음료 제품, 겔 형태 제품, 타블렛 및 환 제품 등을 개발하고자 하였으며 아울러 생약재를 함께 사용하여 제품의 품질을 높이고자 하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 음료 제품 I

음료 제품 I 은 propolis 추출물, 과즙, 벌꿀, 비타민 C 등을 혼합하여 제조한 후 기호도 검사를 통해 품질을 개선하였다.

2. 음료 제품 II

음료 제품 II는 propolis 추출물, 천궁 당액, 벌꿀, 갈근 추출물 등을 혼합하여 제조하였다.

3. 겔 형태 제품

겔 형태 제품은 propolis 추출물, 덱스트린, 천궁 당액을 혼합하여 제조하였으며 제조 공정은 Figure 9와 같다.

Figure 9. Flowsheet for preparation of gel-type product

4. 타블렛 제품

타블렛 제품은 propolis 추출물, 덱스트린, 변성 전분 등을 원료로 제조하였다. 제조과정은 Figure 10과 같다.

Figure 10. Flowsheet for preparation of tablet product

5. 환 제품

환 제품은 propolis 추출물, 벌꿀, 현미 가루, 숙지황 등을 원료로 하여 제조하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

Propolis 추출물을 제품화하기 위해서는 추출물이 식품에 적용하기 용이해야 하나 propolis의 경우에는 그 적용이 매우 어렵다. 우선 propolis의 경우에는 추출물을 만들기 위한 용매로 에탄올을 사용해야 하는데, 이것은 물을 사용할 경우 추출 수율이 매우 낮고 유용 성분인 flavonoid가 용출되지 않기 때문이다. 따라서 propolis 추출물은 에탄올로 제조하고 이를 제품의 소재로 이용할 때에는 에탄올 추출물을 직접 이용하는 방법과 농축 과정을 통해 에탄올을 제거한 농축물을 이용하는 방법을 생각할 수 있다. 그러나 에탄올 추출물을 직접 이용할 경우에는 식품 중에 함유될 수 있는 에탄올 허용 기준량 때문에 propolis 추출물이 고농도로 함유된 제품을 제조하는 것이 불가능하게 된다. 그래서 에탄올 추출물은 음료와 같이 고농도 추출물이 필요하지 않은 제품에 적용하게 되었다. 한편, 농축물은 겔 형태나 타블렛 등의 제품에 적합하며 겔 형태 제품 적용시에는 물과 혼합되어 침전물 형성이나 층 분리가 발생하지 않도록 할 수 있는 부형재의 사용이 필요하다. 타블렛 제품의 경우에는 propolis 추출물을 분말화하는 것이 가장 중요하나 추출물 자체만으로는 분말이 되지 않으며 덱스트린 등의 부형재를 혼합하여야만 분말이 형성되었다. 이상과 같은 propolis 추출물의 특성을 이용하여 추출물을 이용한 음료, 겔 형태, 타블렛 및 환 제품을 제조하였으며, 특히 음료는 2가지 형태로 하였다.

1. Propolis 추출물을 이용한 음료 제품 I

음료 I을 제조하기 위해 먼저 첨가물과 배합비가 다른 2가지 종류의 음료를 제조하였으며 배합비는 Table 14와 같다.

Table 14. Recipe for propolis drink

Type A		Type B	
· 프로폴리스 추출물	0.5%	· 프로폴리스 추출물	0.2%
· 사과쥬스	10%	· 구루메	0.01%
· 혼합과일향	0.2%	· 배과즙	10%
· 액상과당	12%	· 혼합과일향	0.065%
· 구연산	0.23%	· 올리고당	8.8%
· 벌꿀	1.0%	· 액상과당	7.5%
· Vit.C	0.1%	· 구연산	0.25%
· Ethanol	0.5%	· 벌꿀	1.0%
· 올리고당	1.0%	· Vit.C	0.05%
· 정제수	74.47%	· 구연산나트륨	0.03%
		· 베타카로틴수용액	0.03%
		· 허브향	0.035%
		· 파인트리향	0.01%
		· 정제수	72.02%

이 2가지 형태의 배합비를 기초로 하여 맛과 향 등의 기호성을 조사한 결과 B 제품이 더 좋은 것으로 나타났으나 기호성의 개선이 필요할 것으로 판단되어 이를 중점적으로 배합비를 달리한 4가지 음료(sample 1 4)를 제조하였다.

Table 15. Recipe for propolis drink (sample 1)

프로폴리스 추출물 (10%)	0.5%	0.5ml
사과쥬스	10.0%	10ml
올리고당	8.8%	8.8g
고과당	6.5%	6.5g
벌꿀	2.0%	2.0g
구연산	0.23%	0.23g
vit. C	0.1%	0.1g
구연산나트륨	0.03%	0.03g
베타카로틴	0.03%	0.03g
타우린	1.0%	1.0g
혼합과일향	0.065%	0.065ml
허브향	0.035%	0.035ml
파인트리향	0.01%	0.01ml
프로폴리스 essential oil	0.5%	0.5ml
정제수	70.2%	70.2ml

- 정제수 20ml + 사과쥬스 10ml + 올리고당 + 액상과당(고과당) + 꿀
- 타우린 + 구연산 + 구연산나트륨 + 비타민 C + 베타카로틴 (무게정량후 정제수를 혼합하여 첨가)
- 혼합과일향 + 허브향 + 파인트리향
- propolis 추출물을 온수에 첨가하고 교반후 혼합
- Essential oil(essential oil이 미량 혼합된 물)
- 나머지 정제수

Sample 1은 propolis 추출물의 농도를 높였으며, 구루메 및 배 농축액 대신 사과쥬스를 첨가하여 색을 개선하였다. 또한 타우린을 첨가하여 영양 성분을 보강하였으며 propolis를 가지고 직접 essential oil을 추출하여 첨가하였다. 그러나 단맛, 떫은맛, 신맛이 강하여 이에 대한 개선이 필요한 것으로 나타났다.

Table 16. Recipe for propolis drink (sample 2)

프로폴리스 추출물 (10%)	0.5%	0.5ml
사과쥬스	10.0%	10ml
올리고당	5.0%	5.0g
고과당	3.5%	3.0g
벌꿀	2.0%	2.0g
구연산	0.15%	0.15g
vit. C	0.1%	0.1g
구연산나트륨	0.01%	0.01g
베타카로틴	0.03%	0.03g
타우린	1.0%	1.0g
한약재향	0.05%	0.05ml
허브향	0.035%	0.035ml
파인트리향	0.01%	0.01ml
정제수	78.2%	78.2ml

- 정제수 20ml + 사과쥬스 10ml + 올리고당 + 액상과당(고과당) + 꿀
- 타우린 + 구연산 + 구연산나트륨 + 비타민 C + 베타카로틴 (무게정량후 정제수를 혼합하여 첨가)
- 한약재향 + 허브향 + 파인트리향
- propolis 추출물을 온수에 첨가하고 교반후 혼합
- 나머지 정제수

Sample 2는 단맛 성분과 신맛 성분을 일부 줄였고, 혼합과일향을 한약재향으로 대체하였다. 관능검사 결과 향은 좋은 것으로 평가를 받았으나 단맛이 약하고 신맛은 여전히 강한 것으로 나타나 이에 대한 개선이 필요한 것으로 나타났다.

Table 17. Recipe for propolis drink (sample 3)

프로폴리스 추출물 (10%)	0.5%	0.5ml
사과쥬스	10.0%	10ml
올리고당	6.0%	6.0g
고과당	5.0%	5.0g
벌꿀	2.0%	2.0g
구연산	0.1%	0.1g
vit. C	0.1%	0.1g
구연산나트륨	0.01%	0.01g
베타카로틴	0.03%	0.03g
타우린	1.0%	1.0g
한약재향	0.05%	0.05ml
허브향	0.035%	0.035ml
파인트리향	0.01%	0.01ml
정제수	75.2%	75.2ml

- 정제수 20ml + 사과쥬스 10ml + 올리고당 + 액상과당(고과당) + 꿀
- 타우린 + 구연산 + 구연산나트륨 + 비타민 C + 베타카로틴 (무게정량후 정제수를 혼합하여 첨가)
- 한약재향 + 허브향 + 파인트리향
- propolis 추출물을 온수에 첨가하고 교반후 혼합
- 나머지 정제수

Sample 3은 단맛 성분을 sample 2보다 높이고 신맛 성분을 일부 줄였다. 관능검사 결과 단맛은 적당한 것으로 나타났으나 신맛이 강하여 개선할 필요가 있는 것으로 나타났다.

Table 18. Recipe for propolis drink (sample 4)

프로폴리스 추출물 (10%)	0.5%	0.5ml
사과쥬스	10.0%	10ml
올리고당	6.0%	6.0g
고과당	5.0%	5.0g
벌꿀	2.0%	2.0g
구연산	0.05%	0.05g
vit. C	0.05%	0.05g
구연산나트륨	0.01%	0.01g
베타카로틴	0.03%	0.03g
타우린	1.0%	1.0g
한약재향	0.05%	0.05ml
허브향	0.035%	0.035ml
파인트리향	0.01%	0.01ml
정제수	75.2%	75.2ml

- 정제수 20ml + 사과쥬스 10ml + 올리고당 + 액상과당(고과당) + 꿀
- 타우린 + 구연산 + 구연산나트륨 + 비타민 C + 베타카로틴 (무게정량후 정제수를 혼합하여 첨가)
- 한약재향 + 허브향 + 파인트리향 + propolis 추출물
- 나머지 정제수

Sample 4는 신맛 성분의 첨가량을 줄였으며 지금까지와는 달리 propolis 추출물을 온수에 용해하지 않고 냉수에 직접 분산하였다. 관능검사 결과 기호도가 매우 좋은 것으로 나타났으며 음료 Ⅰ의 최종 제품으로 선정하였고 제품은 별첨의 사진 1과 같다 .

2. Propolis 추출물을 이용한 음료 제품Ⅱ

음료 Ⅱ는 천궁등의 생약재 추출물과 propolis 추출물을 혼합하여 음료를 제조하였고 제조방법은 다음과 같다. 먼저 천궁 당액을 제조하는데 천궁과 오미자를 일정 비율로 혼합한후 일정 농도의 당액에 침지하여 10 20일 정도 보관한 후 여과하였다. 여과액을 농도가 55Brix가 되도록 하고 여기에 갈근 추출물을 혼합하였다. 갈근 추출물은 갈근과 증류수를 1 : 50의 비율로 한 후 열수 추출하고 여과한 후 여과액을 사용하였다. 천궁 당액과 갈근 추출물에 propolis 추출물 및 꿀을 비롯한 기타 첨가물과 정제수를 혼합하여 음료 Ⅱ를 제조하였다. 음료 Ⅱ는 관능검사에서 기호성이 매우 좋은 것으로 나타났고 참여기업인 상주축산양봉조합으로부터 음료Ⅰ 보다 좋은 평가를 받았으며 음료 Ⅱ를 제품 생산 품목으로 선정하였다. 제품은 별첨의 사진 2와 같다.

3. Propolis 추출물을 이용한 겔 형태 제품

겔 형태의 제품이란 우리에게 일반적으로 알려진 짜먹는 위장약 형태의 제품을 의미하며 물성은 반 유동체이다. Propolis 추출물을 이용한 겔 형태 제품 개발을 위하여 꿀을 비롯한 첨가물 등의 부재료와 propolis 추출물 및 천궁 당액을 일정 비율로 혼합한 후 균질화 하여 제품으로 하였다. 이 제품은 음료에 비해 propolis 추출물의 농도가 20 30배 높은 것이 특징이다. Propolis 추출물은 에탄올로 추출, 제조한 것이기 때문에 고농도로 물에 첨가할 경우 침전물이 형성되는 등 분산성이 문제점으로 남게 된다. 이러한 문제를 해결하기 위해 균질기를 이용

하는 한편, 덱스트린을 첨가하여 분산이 잘 되도록 하였고, 제품의 점성을 높이기 위해 변성 전분을 사용하였다. 이 제품도 상주양봉조합에서 매우 좋은 평가를 받았고 제품은 별첨의 사진 3과 같다.

4. Propolis 추출물을 이용한 타블렛 제품

타블렛 제품을 제조하기 위해서는 propolis 추출물을 분말 형태로 만들어야 하는데 propolis 추출물 중에 함유되어 있는 수지 등의 성분으로 인하여 분말화가 매우 어려운 것으로 알려져 있다. 따라서 추출물 자체를 완전 건고 시키지 않은 상태에서 부형재를 혼합하여 분말화하는 방법을 시도하였다. 분말화 및 제품 제조 방법은 다음과 같다. 먼저 propolis 추출물 10g에 덱스트린 60g, 뜨거운 물 40ml를 가한 후 homogenizer로 12,000rpm에서 10분간 균질화 하였다. 여기에 열수 20ml를 재차 가한 후 같은 방법으로 균질화하였으며 이것을 동결건조기로 건조한 후 분쇄하여 분말화하였다. 타블렛 제품은 이 propolis 추출물 분말 40g에 polydextrose 30g, 유청칼슘 30g, 효모 200g을 혼합하여 타정기로 제조하였다. 타블렛 제품은 별첨의 사진 4와 같다.

5. Propolis 추출물을 이용한 환 제품

본래 환 제품은 계획서에는 없는 품목이었으나 propolis 추출물을 이용한 타블렛 제품을 만들기 위한 예비 시험 과정에서 환 제품에 대한 가능성이 있어 시도해 보았다. 사용한 재료는 propolis 추출물, 꿀, 현미가루, 숙지황 등이며 제조 방법은 다음과 같다. 먼저 propolis 추출물(고형분 함량 40%) 5g에 덱스트린 30g, 뜨거운 물 30ml, 꿀 15g을 혼합하고 homogenizer로 12,000rpm에서 10분간 균질화 한다. 이 혼합물에 꿀 20g, 현미 190g, 숙지황 추출물(5.4 Brix) 60ml를 가하여 환을 제조 하였다. 이때 사용한 현미는 160℃에서 10분간 볶은 후 분쇄하여 60mesh의 체를 통과한 것으로 하였다. 환 제품은 propolis를 쉽게 섭취할 수 있다는 점에서 제품의 가치는 충분하나 식품으로의 허가가 어렵다는 점이 문제점이다. 제품은 별첨의 사진 5와 같다.

제 4 절 참고문헌

1. **김종태, 이수정, 황재관, 김철진, 안병학** : Propolis**의 첨가가 식빵의 저장수명과 노화에 미치는 영향**. ***한국식품과학회지***, 29(5), 982-986 (1997)
2. Dessouki, T.M., El-Dashlouty, A.A., El-Ebzary, M.M. and Heikal, H.A. : Propolis and some other natural antioxidants for fats of frozen meat. *Agricultural Research Review*, 58(3), 311-320 (1980)
3. Cheng, P.C. and Wong, G. : Honey bee propolis ;prospects in medicine, *Bee World*, 77(1), 8-15 (1996)
4. **보건복지부** : **식품공전**, **한국식품공업협회**, p.475 (1997)

[별첨 1]

사진 1. Propolis 음료 I

[별첨 2]

사진 2. Propolis 음료 II

[**별첨** 3]

사진 3. Propolis **겔 형태제품**

[별첨 4]

사진 4. Propolis 타블렛 제품

[별첨 5]

사진 5. Propolis 환제품

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림 특정연구사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때는 반드시 농림부에서 시행한 농림특정연구사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학 기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.