

오존화 올리브유의 항균성 및 변이원성 평가

장일웅 · 이승재 · 안정엽¹ · 미우라 토시아키² · 정문웅³ · 최동성*

우석대학교 식품생명공학과, ¹(주)생그린 기술연구소, ²홋카이도대학 대학원 약학연구과,
³우석대학교 외식산업조리학과

Evaluation of Antimicrobial Activity and Mutagenicity of Ozonized Olive Oil

Il-Woong Jang, Seung-Jae Lee, Jeung-Youb Ahn¹, Toshiaki Miura², Mun-Yhung Jung³, and Dong-Seong Choi*

Department of Food Biotechnology, Woosuk University

¹R&D Institute, Saenggreen Co.

²Graduate School of Pharmaceutical Science, Hokkaido University

³Department of Food Industry & Management, Woosuk University

Abstract Ozonized olive oil was tested for its mutagenic potential in a *Salmonella*/microsome assay. Additionally, antimicrobial activity was tested against *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, pathogenic strains related to acne, using the paper disk and agar dilution method. Ozonized olive oil showed antimicrobial activities against all the strains tested, with minimal inhibitory concentrations (MICs) values in a range of 2~10 mg/mL. Mutagenicity of ozonized olive oil was evaluated with *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 and TA1535, with and without addition of S9 mixture. No increase in the number of *his*⁺ revertants over the negative control (solvent and non-ozonized olive oil) values was observed with TA98 (1,000 µg/plate), TA100 (1,500 µg/plate) and TA1535 (1,500 µg/plate) strains. The results from this study suggested that ozonized olive oil does not show any mutagenic potential.

Key words: ozonized olive oil, antimicrobial activity, acne, mutagenicity, Ames test

서 론

다핵형 백혈구와 같은 작용을 하는 오존은 19세기부터 피부 깊숙한 곳에 일어나는 감염증, 즉 궤양, 농양, 누공과 같은 질환을 치료하는 데에 사용되어 왔다(1). 오존은 독성이 적으면서 세균, 원생동물, 효모, 곰팡이 등 다양한 종류의 미생물을 치사시킬 수가 있으며, LD₅₀은 경구투여 시 16.5 g/kg, 복강투여 시 1.6 mL/kg으로 치료효과가 있는 용량에서도 인체에 해가 없는 것으로 알려져 있다(2). 오존은 1997년 미국 FDA에 의해 Generally Recognized as Safe (GRAS) 품목으로, 2000년 8월에는 기체와 액체 상태로 식품의 가공, 처리, 저장 중에 직접 식품첨가제로 사용이 승인되어 안정성을 인정받았다(3,4).

대기 중의 오존은 빠른 속도로 불안정한 상태로 변하기 때문에 식물성 오일을 오존화하게 되면 ozonides를 형성, 연고상으로 안정하게 되어 입상에 사용하는 오존의 안정성을 높일 수가 있다(5). Oleic acid를 주성분으로 하는 올리브유에 오존-산소 혼합기체를 통과시키면 올리브유는 질량비 16%의 오존을 흡수해서

백색 왁스상의 오존화 올리브유(ozonized 또는 ozonated olive oil)로 변하게 되며(6), 오존화 올리브유는 4°C에서 2~5년간 안정한 상태를 유지한다(7). 오존화 유는 독일을 중심으로 유럽에서 오래전부터 부작용이 거의 없는 피부질환 치료제로서 사용되어 왔는데(6), 지금도 혐기성 감염증, 헤르페스 감염증(HHV I, II), 진균 질환, 좌창, 영양장애성 궤양, 화상, 봉소염, 농양, 항문열상, 욕창, 누공, 치은염, 외음질염 등의 치료에 사용되고 있다(7). 또한 쿠바에서는 오존화 해바라기씨 유가 같은 목적으로 사용되고 있으며, 이것을 캡슐에 넣어 경구약으로서 위염, 십이지장 궤양, 소화성 궤양, 편모충증의 치료에 사용하고 있다(6). 이러한 식물성 오존화 유에 항균 및 항진균 작용이 있음이 다수의 연구자에 의해 연구되어 있다(8-11). 오존화 올리브유의 구조에 대해서는 Miura 등(12)의 연구에 의해 올리브유를 구성하는 불포화지방산의 모든 탄소-탄소 이중결합이 오존화에 의해 ozonide로 변환하여 안정된 triglyceride의 이성체 혼합물을 형성하고 있으며, 그의 주성분은 triolein triozone임이 밝혀져 있다.

독일을 비롯한 유럽 각국에서는 처방전이 있으면 오존화 올리브유를 대부분의 약국에서 손쉽게 구할 수가 있으며, 피부 감염증 환부의 살균과 치유 촉진을 위해 국소적으로 사용된다고 한다. 아직 한국에서는 오존화 올리브유의 존재가 잘 알려져 있지 않은 상태이나 일본에서 시판되고 있는 오존화 올리브유의 여드름 치료용 소재로서의 사용 가능성을 알아보기 위하여 여드름 형성 미생물의 생육에 미치는 효과를 조사하였고, 오존화 올리브유의 안전성을 위한 미생물 변이원성을 검토하였기에 보고하고자 한다.

*Corresponding author: Dong-Seong Choi, Department of Food Biotechnology, Woosuk University, Samrye, Jeonbuk 565-701, Korea

Tel: 82-63-290-1430

Fax: 82-63-290-1429

E-mail: dschoi@woosuk.ac.kr

Received August 16, 2006; accepted November 24, 2006

재료 및 방법

재료 및 시약

본 연구에 사용된 실험재료인 오존화 올리브유(오존화율 16%)는 Oteclabo(Japan)에서 구입하여 사용하였다. Ozonized methyl oleate(normal ozonide, 2a:cis 2b:trans)는 일본 홋카이도대학 대학원 약학연구과 분 석화학연구실에서 제조, 분리 정제한 것을 사용하였으며, 표준물질인 oleic acid와 methyl oleate는 Sigma사, azelaic acid는 Aldrich사에서 구입하여 4°C에 보관하면서 사용하였다.

2-Aminoanthracene(2-AA), sodium azide(SA), 2-nitrofluorene(2-NF)은 Aldrich(USA)사 제품을, tetracycline, NADP(β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate), D-glucose 6-phosphate, β -naphthoflavone, dimethyl sulfoxide(DMSO)은 Sigma(USA)사 제품을, brain heart infusion, tryptic soy broth, nutrient agar, bacto agar는 Difco사 제품을, Oxoid nutrient broth No. 2는 Oxoid사 제품을, 기타 시약은 1급 이상의 제품을 사용하였다. 실험용 rat(male, Sprague Dawley)는 대한실험동물(대전)로부터 구입하여 사용하였다.

균주 및 배지

항균성 실험에 사용하는 여드름 관련 균주인 *Propionibacterium acnes* KCCM 41747, *Staphylococcus epidermidis* KCCM 35494, *Pseudomonas aeruginosa* KCCM 11800는 한국중균협회에서, *Staphylococcus aureus* KCTC 1916은 한국생명공학연구원 유전자은행에서 분양받아 사용하였고, 각 균주별 사용배지와 배양조건은 Table 1과 같다. 변이원성 평가 실험에 사용하는 균주인 *Salmonella typhimurium* TA98과 TA100, TA1535는 한국생명공학연구원 유전자은행으로부터 분양 받아 각각의 유전형질을 확인한 후 사용하였으며, 균주의 유전적 특징은 Table 2와 같다. 균주는 각각의 배지에서 배양한 다음 20% glycerol과 1:1로 혼합, 급속 동결하여 -70°C에 보존하였으며, 보관 균주를 해당 배지에서 37°C, 24시간 배양하여 활성화시킨 후 실험에 사용하였다.

S9 분획 조제

S9 분획의 조제는 Ong 등의 방법(13)에 따라서 조제하였으며, 실험용 동물로는 200 ± 10 g의 7주령 된 rat(male, Sprague Dawley)를, 유도물질로는 phenobarbital과 β -naphthoflavone을 사용하였다.

Table 1. Media and culture conditions of tested microorganisms for antimicrobial activity

Strains	Medium	Incubation condition
<i>P. acnes</i>	Brain Heart Infusion (BHI)	37°C, 5% CO ₂ , 48 h
<i>P. aeruginosa</i>	Nutrient broth	37°C, 200 rpm, 12 h
<i>S. aureus</i>	Nutrient broth	37°C, 200 rpm, 12 h
<i>S. epidermidis</i>	Tryptic soy broth	37°C, 12 h

Table 2. Genetic characteristics of *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 and TA1535 used in the *Salmonella*/microsome assay (Ames test)

Strains	Histidine mutation	LPS ¹⁾	Repair ²⁾	R-factor ³⁾	Mutation characteristics
TA98	<i>hisC3052</i>	<i>rfa</i>	Δ <i>uvrB</i>	+R	Frame shift
TA100	<i>hisG46</i>	<i>rfa</i>	Δ <i>uvrB</i>	+R	Base substitution
TA1535	<i>hisD46</i>	<i>rfa</i>	Δ <i>uvrB</i>	+R ⁴⁾	Base substitution

¹⁾The *rfa* mutation (deep rough character) causes partial loss of the lipopolysaccharide (LPS) barrier that coats the surface of the bacteria.

²⁾The deletion (Δ) through character *uvrB* includes the nitrate reductase (*chl*) and biotin (*bio*) gene.

³⁾R-factor plasmid, pKM101, contains the ampicillin resistance factor.

⁴⁾R-factor plasmid, pKM1002, contains the ampicillin resistance factor.

다. 조제된 S9 분획은 에펜도르프 튜브에 0.5 mL씩 분주하여 -70°C에 보관하면서 사용하였다. S9 mix는 Ames 등의 방법(14)에 따라 조제하였다.

Paper disk method에 의한 antimicrobial activity 시험

오존화 올리브유의 항균효과는 National Committee for Clinical Laboratory Standards(NCCLS)의 지침(15)에 준하여 disk diffusion method로 측정하였다. 오존화 올리브유를 DMSO에 용해하여 400 mg/mL 농도로 시료 원액을 조제하고 농도별 희석액을 제조하였다. Table 1의 배지 및 배양조건에서 배양한 각각의 공시균주 0.1 mL(최종 접종농도 10⁷ CFU)를 도포한 agar plate 표면 위에 paper disk(diameter 6 mm, Wattman No. 2)를 가볍게 올려놓고 조제한 시료액 25 μ L를 조심스럽게 떨어뜨려 흡수시켰다. 페이퍼 디스크에 흡수시킨 오존화 올리브유의 농도는 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10, 12, 16, 20 mg이었다. *P. acnes*는 혐기 조건(5% CO₂)에서 48시간, *S. epidermidis* 및 *S. aureus*, *P. aeruginosa*는 12시간 37°C에서 배양한 후 생육 저지환(clear zone)의 크기를 analytical pakimeter(TESSA-CAL[®] IP67, Swiss)로 측정하였고, 각각의 실험은 2반복 2 plate 씩 실시하였다. 생육저지환의 크기는 $[W = (T - D)/2]$ 로 계산하였고, 생육 저지환의 직경(mm)은 W, 페이퍼 디스크와 저지환의 전체 직경은 T, 페이퍼 디스크의 직경은 D로 나타내었다(16).

Minimal inhibitory concentration(MIC) 시험

오존화 올리브유의 최소저해농도(MIC)는 NCCLS의 지침(17)에 따라 agar dilution method로 평가하였다. 미생물 종류에 따른 각각의 배지 및 배양조건(Table 1)에서 배양한 각각의 공시균주 0.1 mL(최종 접종농도 1.2~1.3 × 10⁵ CFU)를 각각의 고체배지 위에 옮기고 glass spreader를 사용하여 배지 상에 골고루 분포되도록 도포한 다음, 각각의 온도에서 12~48시간 배양하여 균수를 계측하였다. 고체배지는 각각의 배지 15 mL와 0.4% Tween 80에 최종 농도가 1, 1.5, 2, 4, 5, 6, 8, 10 mg/mL가 되도록 조제한 오존화 올리브유 액 5 mL를 혼합하여 제조하였다. MIC는 일정시간 배양 후 미생물의 생육을 관찰할 수 없는 오존화 올리브유의 최소 농도로 정하였고, 시험 미생물의 생육을 50% 저해하는 최소 농도를 MIC₅₀으로 하였다. 표준물질로 azelaic acid와 tetracycline을 사용하였다. 각 실험은 2반복 2 plate 씩 실시하였다.

변이원성 실험

변이원성 실험은 Ames test를 개량한 pre-incubation 방법(14)으로 실시하였다. 멸균시킨 시험관에 직접 변이원성 평가를 위해서는 0.1 M 인산나트륨 완충용액(pH 7.2) 0.5 mL, 간접 변이원성 평가를 위해서는 0.5% S9 mix 0.5 mL를 각각 첨가하고, 여기에 DMSO에 용해한 각 농도의 오존화 올리브유 50 μ L, DMSO 50

Table 3. Inhibitory effect (clear zone diameters in mm) of ozonized olive oil on the growth of pathogenic strains related to acne

Dose (mg/mL)	Clear zone diameter (mm)			
	<i>P. acnes</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
20	7.7 ± 0.6	5.3 ± 0.2	5.6 ± 0.5	5.5 ± 0.6
16	6.0 ± 0.8	4.3 ± 0.1	4.8 ± 0.2	4.6 ± 0.7
12	5.3 ± 0.4	3.3 ± 0.6	4.5 ± 0.7	4.3 ± 0.5
10	3.0 ± 0.2	3.6 ± 0.1	4.6 ± 0.1	4.7 ± 0.1
8	2.1 ± 0.1	3.1 ± 0.0	4.5 ± 0.4	3.9 ± 0.7
6	2.1 ± 0.7	2.7 ± 0.3	3.8 ± 0.3	3.8 ± 0.8
4	2.1 ± 0.7	3.1 ± 0.8	2.7 ± 0.1	2.4 ± 0.4
2	0	2.6 ± 0.1	2.8 ± 0.3	2.0 ± 0.2
1	0	2.8 ± 0.2	2.3 ± 0.2	1.8 ± 0.1
0.5	0	0	1.4 ± 0.4	1.9 ± 0.2

Values are mean ± S.D. of four plate (duplicate and two independent experiments). Bacterial growth was not inhibited by non-ozonized olive oil (20 mg/mL).

μL, Oxoid nutrient broth No. 2에 O/N 배양시킨 균 배양액(1~2×10⁹ CFU/mL) 100 μL를 혼합하고, 37°C에서 210 rpm으로 20분간 진탕 배양하였다. 배양액에 0.5 mM histidine과 biotin을 함유한 top agar 2 mL를 혼합한 후 minimal glucose agar plate(agar 15 g, 멸균수 930 mL, 50×VB salt 20 mL, 40% glucose 50 mL) 상에 도포, 평판 고화시킨 다음, 37°C에서 48시간 배양하여 발생한 복귀 돌연변이주(*his*⁺ revertant colony)의 수를 계수하여 변이원성을 판정하였다. 시료는 최종 농도가 plate 당 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 5.0 mg이 되도록 첨가하였다. Negative control(spontaneous revertant)을 위해서는 시료 대신에 DMSO 100 μL 및 올리브유를, positive control을 위해서는 시료 대신에 SA, 2-NF, 2-AA를 변이원으로 사용하였다. 각각의 실험은 2반복 2 plate 씩 실시하였다.

결과 및 고찰

항균활성(antimicrobial activity) 평가

여드름을 일으키는 공시 미생물 4균주에 대한 오존화 올리브

유의 항균활성을 paper disk method로 평가한 결과는 Table 3과 같다. *P. acnes* 및 *S. epidermidis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*에 대하여 항균활성을 나타내기 시작한 농도는 각각 4, 1, 0.5, 0.5 mg/mL이었고, 4 공시 균주에 대한 20 mg/mL 농도에서의 생육 저지환의 크기는 각각 7.7, 5.3, 5.6, 5.5 mm이었다. 오존화 올리브유에 대해 *S. epidermidis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*는 감수성이 큰 세균임을 알 수 있었다. Rodrigues 등(10)은 오존화 해바라기씨유(제품명: Bioperoxoil[®])의 3.5, 7.0, 10.5 mg/mL 농도에 있어서 *S. aureus* 및 *P. aeruginosa*에 대한 저해율(mm/mg oil, 생육 저지환의 크기를 페이퍼 디스크에 흡수시킨 오존화 유의 양으로 나눈 값)이 각각 0.62, 0.53이었다고 보고하였는데, 오존화 올리브유의 경우 4 mg과 8 mg/mL 농도에서의 *S. aureus*와 *P. aeruginosa*에 대한 저해율은 각각 0.62, 0.55로 Bioperoxoil[®]과 같은 정도의 항균활성을 나타내었다.

오존화 오일의 최소저해 농도

오존화 올리브유의 공시 균주에 대한 최소저해 농도를 측정된 결과는 Table 4와 같다. 공시 균주의 50% 생육 저해활성을 표시하는 MIC₅₀은 *P. acnes*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*에 대해 2 mg/mL, *S. epidermidis*에 대해 4 mg/mL로 나타났으며, 미생물의 생육이 관찰되지 않는 MIC 농도는 *P. acnes*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*에 대해 8 mg/mL, *S. aureus*에 대해 10 mg/mL로 나타났다. MICs 농도가 2~10 mg/mL라는 본 연구의 결과는 Bioperoxoil[®]의 *S. aureus*, *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. typhimurium*에 대한 MIC가 7.0 mg/mL이었다는 Rodrigues 등(10)의 결과, Oleozon[®]의 *mycobacteria*, *staphylococci*, *streptococci*, *enterococci*, *Pseudomonas*, *E. coli* 등에 대한 MIC가 0.95~9.5 mg이었다는 Sechi 등(9)의 결과와 거의 일치하였다. 한편 Lezcano 등(8)은 Oleozon[®]의 methicillin에 대해 감수성과 내성을 나타내는 *S. aureus*와 *S. epidermidis*에 대한 MIC₅₀과 MIC₉₀의 농도 범위는 2.37~9.5 mg/mL, MIC 농도는 187.5~950 mg/mL라고 보고한 바 있다.

변이원성 평가

S. typhimurium TA98, 100, 1535 균주에 대한 오존화 올리브유의 변이원성을 실험한 결과는 Table 5와 같다. S9 mix를 첨가하지 않고 실시한 직접 돌연변이원으로서의 변이원성을 평가한 실험에서 3균주 모두 2,500 μg/plate에서 세포독성을 나타내었고,

Table 4. MICs determination of ozonized olive oil against pathogenic strains related to acne

Dose (mg/mL)	Number of CFU			
	<i>P. acnes</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Olive oil (20 mg)	1224 ± 137	1298 ± 128	1319 ± 85	1178 ± 45
Azelaic acid (30 μg/mL)	352 ± 80	678 ± 64	615 ± 64	633 ± 80
Tetracycline (50 μg/mL)	526 ± 77	470 ± 25	537 ± 97	570 ± 136
10	0	0	0 ¹⁾	0
8	0 ¹⁾	0 ¹⁾	5 ± 2	0 ¹⁾
6	88 ± 10	222 ± 9	10 ± 5	130 ± 13
5	130 ± 10	530 ± 11	140 ± 23	302 ± 13
4	144 ± 29	675 ± 38 ²⁾	445 ± 19	341 ± 18
2	575 ± 15 ²⁾	854 ± 13	550 ± 33 ²⁾	567 ± 112 ²⁾
1.5	747 ± 24	934 ± 34	1284 ± 205	874 ± 16
1	814 ± 24	1264 ± 67	1447 ± 127	1241 ± 56

Values are mean ± S.D. of four plate (duplicate and two independent experiments).

¹⁾MIC was defined as the lowest concentration at which no visible bacteria growth on the agar medium was observed.

²⁾MIC₅₀ was the minimal concentration inhibiting 50% of visible bacteria growth.

Table 5. Mutagenicity testing of ozonized olive oil in the Salmonella/ microsome assay

Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of <i>his</i> ⁺ revertant					
	TA98		TA100		TA1535	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
5,000	1 \pm 3	0	1 \pm 1	1 \pm 1 ¹⁾	1 \pm 2	0
2,500	0 ¹⁾	0 ¹⁾	0.5 \pm 1 ¹⁾	75 \pm 24	1 \pm 3 ¹⁾	0 ¹⁾
1,500	27 \pm 3	56 \pm 11	89 \pm 11	116 \pm 26	15 \pm 2	12 \pm 4
1,000	12 \pm 2	18 \pm 5	64 \pm 18	116 \pm 18	10 \pm 5	18 \pm 8
500	15 \pm 5	20 \pm 7	106 \pm 15	110 \pm 17	11 \pm 1	22 \pm 7
250	14 \pm 3	16 \pm 4	115 \pm 22	127 \pm 10	14 \pm 4	23 \pm 4
100	12 \pm 2	15 \pm 3	96 \pm 4	124 \pm 7	14 \pm 8	20 \pm 4
50	12 \pm 4	21 \pm 4	91 \pm 17	129 \pm 15	14 \pm 6	13 \pm 2
25	11 \pm 5	23 \pm 5	90 \pm 12	122 \pm 12	11 \pm 3	25 \pm 8
0	15 \pm 3	28 \pm 5	84 \pm 16	117 \pm 10	11 \pm 4	22 \pm 4
NC	11 \pm 3	17 \pm 4	100 \pm 18	115 \pm 3	12 \pm 7	20 \pm 5
PC	423 \pm 10	314 \pm 8	653 \pm 55	804 \pm 39	560 \pm 29	387 \pm 2

Values are mean \pm S.D. of four plate (duplicate and two independent experiments). Dose 0-negative control: 100 μL DMSO; NC-negative control: olive oil (5 mg/plate); PC-positive control: for TA 98/-S9, 2-NF (1 $\mu\text{g}/\text{plate}$) and TA98/+S9, 2-AA (0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$); for TA100/-S9, SA (1 $\mu\text{g}/\text{plate}$) and TA100/+S9, 2-AA (1 $\mu\text{g}/\text{plate}$); for TA1535/+S9, 2-AA (2.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$) and TA1535/+S9, 2-AA (2.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$).

¹⁾Toxicity

TA98은 1,500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 농도에서 *his*⁺ 복귀돌연변이주의 수가 약 2 배로 증가하여 미약한 변이원성을 나타내었으나, TA100과 TA1535는 1,500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 농도에서 변이원성을 나타내지 않았다. S9 mix를 첨가하여 실시한 간접 돌연변이원으로서의 변이원성을 평가한 실험에서 TA98과 TA1535는 2,500 $\mu\text{g}/\text{plate}$, TA100은 5,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 에서 세포독성을 나타내었고, 1,500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 농도에서 TA98은 *his*⁺ 복귀돌연변이주의 수가 약 2배 정도 증가하여 미약한 변이원성을 나타내었으나, TA100과 TA1535는 변이원성을 나타내지 않았다. 이상의 결과로, *Salmonella*/microsome assay에 있어서 오존화 올리브유는 S9 mix의 첨가 유무에 상관없이 TA98에서는 1,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 이하의 농도, TA100과 TA1535에서는 1,500 $\mu\text{g}/\text{plate}$

이하의 농도에서 *his*⁺ 복귀돌연변이주의 수가 증가하지 않았다. 이러한 결과는 독성을 나타내지 않는 농도 범위 내에서 복귀돌연변이주의 수가 용량 의존적으로 증가하는 경우에만 변이원성 양성반응으로 판정하기 때문에 오존화 올리브유가 돌연변이원성을 나타내지 않는다는 것을 시사하고 있다(14).

Extra virgin급 올리브유에는 oleic acid가 주요 불포화지방산으로 약 80% 함유되어 있다. 이 oleic acid의 methyl ester인 methyl oleate를 오존화한 ozonized methyl oleate의 변이원성을 평가하여 오존화 올리브유의 변이원성을 재확인한 결과는 Table 6과 같다. Ozonized methyl oleate는 negative control(DMSO와 methyl oleate) 보다 *his*⁺ 복귀돌연변이주의 수가 증가하지 않았다. S9 mix

Table 6. Mutagenicity testing of ozonized methyl oleate in the Salmonella/microsome assay

Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertant					
	TA98		TA100		TA1535	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
5,000	10 \pm 50	58 \pm 60	9 \pm 3	0		
2,500	16 \pm 30	89 \pm 40	12 \pm 4	0		
1,500	12 \pm 1	0 ¹⁾	116 \pm 20	0 ¹⁾	13 \pm 1	0 ¹⁾
1,000	20 \pm 1	19 \pm 3	109 \pm 13	68 \pm 2	16 \pm 1	13 \pm 2
500	19 \pm 2	16 \pm 2	96 \pm 10	81 \pm 3	11 \pm 3	14 \pm 3
250	18 \pm 2	19 \pm 3	99 \pm 13	97 \pm 3	20 \pm 2	13 \pm 2
100	21 \pm 3	13 \pm 2	92 \pm 12	71 \pm 2	18 \pm 3	13 \pm 2
50	15 \pm 3	26 \pm 2	112 \pm 5	92 \pm 2	19 \pm 4	18 \pm 2
25	19 \pm 3	18 \pm 3	105 \pm 12	76 \pm 3	14 \pm 3	14 \pm 4
10	19 \pm 2	16 \pm 3	96 \pm 7	83 \pm 2	15 \pm 2	14 \pm 6
5	19 \pm 3	19 \pm 3	94 \pm 7	68 \pm 3	19 \pm 1	16 \pm 1
0	20 \pm 4	22 \pm 4	104 \pm 2	91 \pm 5	23 \pm 1	19 \pm 1
NC	21 \pm 6	15 \pm 1	104 \pm 10	90 \pm 8	12 \pm 1	12 \pm 4
PC	368 \pm 24	335 \pm 9	880 \pm 23	980 \pm 4	677 \pm 20	291 \pm 30

Values are mean \pm S.D. of four plate (duplicate and two independent experiments). Dose 0-negative control: 100 μL DMSO; NC-negative control: methyl oleate (5 mg/plate); PC-positive control: for TA 98/-S9, 2-NF (1 $\mu\text{g}/\text{plate}$) and TA98/+S9 2-AA (0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$); for TA100/-S9, SA (1 $\mu\text{g}/\text{plate}$) and TA100/+S9, 2-AA (1 $\mu\text{g}/\text{plate}$); for TA1535/+S9, 2-AA (2.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$) and TA1535/+S9, 2-AA (2.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$).

¹⁾Toxicity

문 헌

를 첨가하지 않고 실시한 직접 돌연변이원으로서의 변이원성을 평가한 실험에서는 3균주 모두 5,000 µg/plate에서 세포독성을 나타내기 시작하였고, 2,500 µg/plate 농도에서 변이원성을 나타내지 않았다. S9 mix를 첨가하여 실시한 간접 돌연변이원으로서의 변이원성을 평가한 실험에서도 3균주 모두 1,500 µg/plate에서 세포독성을 나타내었으나, 1,000 µg/plate 농도 이하에서는 변이원성을 나타내지 않았다. 이상의 실험 결과는 독성을 나타내지 않는 농도 범위 내에서 오존화 올리브유 및 오존화 메칠 올레산이 돌연변이원성을 나타내지 않는다는 것을 시사하고 있다.

본 연구의 결과 오존화 올리브유는 돌연변이원성을 나타내지 않으면서 여드름 형성 원인균에 대해 생육 억제효과를 나타내어 여드름 개선용 화장품 소재로서의 사용 가능성이 높은 것으로 판단되었다. 그러나 이를 이용하기 위해서는 상온에서 고체상태를 유지할 수 있는 기술의 개발, 오존 취의 개선, 개발 제품의 *in vitro* 및 임상에서의 효능 평가 등 다양한 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

요 약

오존화 올리브유의 여드름 치료용 소재로서의 사용 가능성을 알아보기 위하여 여드름 형성에 관여하는 미생물인 *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*와 *Pseudomonas aeruginosa*에 대한 생육 억제효과를 검토하였고, Ames test로 그의 변이원성 유무를 평가하였다. 항균활성을 paper disk 법으로 평가했을 때 *P. acnes*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*에 대하여 항균활성을 나타내기 시작한 농도는 각각 4, 1, 0.5, 0.5 mg/mL이었고, 20 mg/mL 농도에서의 생육 저지환의 크기는 각각 7.7, 5.3, 5.6, 5.5 mm이었다. 50% 생육 저지환성을 표시하는 MIC₅₀은 *P. acnes*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*에 대해 2 mg/mL, *S. epidermidis*에 대해 4 mg/mL로 나타났으며, 미생물의 생육이 관찰되지 않는 MIC 농도는 *P. acnes*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*에 대해 8 mg/mL, *S. aureus*에 대해 10 mg/mL로 나타났다. 최소저해농도(MICs) 범위는 2~10 mg/mL이었다. *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535 균주에 대하여 오존화 올리브유와 오존화 메칠 올레산은 S9 mix의 첨가 유무에 상관없이 세포독성을 나타내지 않는 농도에서 *his*⁺ 복귀돌연변이주의 수가 증가하지 않아 변이원성을 나타내지 않았다. 오존화 올리브유는 돌연변이원성을 나타내지 않으면서 여드름 형성 원인균에 대한 생육 억제효과를 나타내어 여드름 치료용 소재로서 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2005년도 중소기업청 기술혁신개발사업(과제번호 S1007166)의 지원에 의해 이루어졌으며 이에 저자들은 사의를 표하고자 합니다.

1. Wolf A. Eine medizinische verwendbarkeit des ozones. Dtsch. Med. Wschr. 311: 1-5 (1915)
2. Uvaldi A. Relazione sulle prove di tossicit  acute sub-acuta e di calcolo della DL 50 del prodotto bioperoxoil[®] (Della Ditta Ozonoil s. l.). Thesis, Universita' degli studi Parma, Facolta' Di Medicina Veterinaria, Parma, Emilia-Romagna, Italy (1998)
3. Federal Register. Secondary direct food additives permitted in food for human consumption. Federal Register 66. 123: 33829-33830 (2001)
4. Kim JG, Yosef, AE, Chism GW. Use of ozone to inactivate microorganisms on lettuce. J. Food Safety 19: 17-34 (1999)
5. Cardoso CC, Macedo SB, Carvalho JCT. Azione dell'Olio ozonizzato (Bioperoxoil[®]) nelle lesione chirurgiche dei modelli pre-clinici, Farm. Ter. (Int. J. Drug Ther.) 19: 56-60 (2002)
6. Miura T, Yamazaki A, Nochi H, Tamoto K. Mechanism of inflammation of ozonized olive oil. pp. 25-33. In: Proceedings of the 9th Symposium. April 18, Nagai Memorial Hall, Tokyo, Japan. Japan Research Association for the Medical & Hygienic Use of Ozone, Osaka, Japan (2004)
7. Valacchi G, Fortino V, Bocci V. The dual action of ozone on the skin. Br. J. Dermatol. 153: 1096-1100 (2005)
8. Lezczano N, Nunez M, Espino M, Gomez M. Antibacterial activity of ozonized sunflower oil, Oleozon, against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Ozone Sci. Eng. 22: 207-214 (2000)
9. Sechi LA, Lezczano I, Numez N, Espim M, Dupre I, Pinna A, Molicotti P, Fadda G, Zanetti S. Antibacterial activity of ozonized oil (Oleozon). J. Appl. Microbiol. 90: 279-284 (2001)
10. Rodrigues KL, Cardoso CC, Caputo LR, Carvalho JCT, Fiorini JE, Schneedorf JM. Cicatrizing and antimicrobial properties of an ozonized from sunflower seeds. Inflammopharmacology 12: 261-270 (2004)
11. Menendez S, Falcon L, Simon DL, Landa N. Efficacy of ozonized sunflower oil in the treatment of tinea pedis. Mycoses 45: 329-332 (2002)
12. Miura T, Suzuki S, Sakurai S, Matsumoto A, Shinriki N. Structure elucidation of ozonated olive oil. pp. 72-76. In: Proceedings of the 15th Ozone World Congress. September 11, Imperial College, London, UK. International Ozone Association, Scottsdale, AZ, USA (2001)
13. Ong TM, Mukhtar M, Wolf CR, Zeiger E. Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver. J. Environ. Pathol. Toxicol. 4: 55-60 (1980)
14. Ames BN, Maron DM. Revised methods for the *S. typhimurium* mutagenicity test. Mutat. Res. 113: 173-215 (1983)
15. NCCLS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test, 6th edn. Approved Standards, NCCLS document M2-A6. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, USA (1997)
16. Kwak HS, Nam CH, Kwon, HS. A study on the essential oil for hair health care. Korean Public Health Research 31: 27-36 (2005)
17. NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically, 3th edn. Approved Standards, NCCLS document M7-A3. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA, USA (1993)