

참나무 목초액의 항균 및 항산화 활성과 일산화질소 합성 저해연구

정일선 · 김유정 · 갈상완¹ · 최영주*

신라대학교 의생명과학대학 식품영양학과, ¹진주산업대학교 미생물공학과

Received December 14, 2006 / Accepted January 5, 2007

Antimicrobial and Antioxidant Activities and Inhibition of Nitric Oxide Synthesis of Oak Wood Vinegar. Il Sun Jung, Yu Jung Kim, Sang Wan Gal¹ and Young Ju Choi*. *Department of Food and Nutrition, College of Medical Life Science Silla University, Busan 617-736, ¹Department of Microbiological Engineering, Jinju National University Jinju 660-758, Korea* – This study was carried out to investigate the biological effects oak wood vinegar. Antimicrobial activity was tested in five microbial species at the concentration of 5 to 50 μ l of oak wood vinegar by paper disc method. Growth of *P. oleovoranse*, *P. vulgaris*, *E. coli*, *S. aureus* and *Prevotella intermedia* was inhibited at a dose of as low as 50 μ l of oak wood vinegar. Antioxidant activities were measured by using DPPH radical scavenging and SOD-like activity. DPPH radical scavenging and SOD-like activities were 90% and 65% at the concentration of 25 μ l and 50 μ l of oak wood vinegar, respectively. Stimulation of the macrophages RAW264.7 cells with lipopolysaccharide (LPS) resulted in increased production of nitric oxide (NO) in the medium. However, the oak wood vinegar showed marked inhibition of NO synthesis in a dose-dependent manner. This result suggest that oak wood vinegar plays significant role for activation of immune system in the pathogenesis of inflammatory diseases.

Key words – antimicrobial, antioxidant, nitric oxide, wood vinegar

Nitric oxide (NO)는 대식세포와 같은 면역세포에 의해 생성되어 다양한 생리 및 병리적 과정에 관여하는 다기능성 생체분자이다. NO는 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 합성된다. NO는 새로운 유형의 염증매개물질로 주목을 받고 있으며 NOS 및 NO활성을 억제함으로써 염증성 질환의 진행을 억제할 수 있는 것으로 알려져 있다[5].

NO는 대부분의 포유류 동물의 세포내에서 생성되고 신경계에서는 화학적 신호 전달 물질로서, 혈관계에서는 혈압 조절과 혈소판의 응집 및 호중성구의 집합 작용을, 골격근에서는 대사와 근 수축 조절 등 생리학적으로 중요한 역할을 한다. 또한 면역 세포에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 다량으로 외부의 자극에 의해 유전자 수준에서 발현되고 주로 침입한 미생물이나 종양 세포에 대해 독성을 갖는 방어 물질로서 작용하는 것으로 보고되고 있다[16,18].

목초액(wood vinegar)이란 참나무를 탄화(열분해) 하는 과정에서 발생하는 연기와 수증기를 냉각시켜 얻어지는 응축물을 일정기간 정치하면 3개의 층으로 분리되는데 보통 상층(경질유)과 하층(타르)을 분리 제거한 중간층의 수용액을 말한다. 목초액은 담갈색의 산성 액상 천연물질로서 대부분이 수분이고 나머지는 유기산류, 페놀류, 카르보닐화합물류, 알코올류 등 200여종의 유기화합물과 다수의 미네랄성분이 함유되어 있는 복합적인 추출물로서 pH는 3-4정도이다[12].

현재까지 항균, 살균, 보존성 향상, 항산화효과 및 가공식

품 등에 식품용 첨가제로 사용되고 있으며[7,9,21], 농업 및 환경 분야에서 토양살균, 축산분뇨의 탈취, 작물의 병해충방지, 퇴비발육촉진, 식물생장촉진효과 등 토양환경개선에 광범위하게 이용되고 있다[6,13]. 최근에는 항당뇨효과, 아토피성 피부염의 치료효과, 면역조절효과 등 우수한 약리 및 임상 효능이 있는 것으로 알려지고 있다.

식품첨가물로서 사용되는 목초액은 스모그향(smoke flavor)이란 이름으로 일부 사용되고 있으나 품질수준이 정제도에 따라 허용기준이 엄격히 규제되고 있기 때문에 목초액의 제조 및 식품분야에 응용하기 위해서는 아직까지 많은 연구가 체계적으로 수행되어야 한다.

따라서 본 연구에서는 참나무 목초액의 항산화제, 항균 활성, 면역기능 및 cell viability에 미치는 영향 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 목초액은 경상남도 김해시 소재 숯가마에 참나무를 넣고 탄화시킬 때 발생하는 연기와 수증기를 냉각, 응축시킨 것을 정제하여 만든 참나무 목초액을 사용하였으며 실험에 사용된 시약들은 Sigma사, Aldrich사, Merck사 등 모두 특급 이상을 사용하였다.

균주 및 배양조건

본 실험에 사용된 균주는 식중독 원인균주인 *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* 는 37°C, *Pseudo-*

*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5459, Fax : +82-51-999-5176

E-mail : yjchoi@silla.ac.kr

monas. oleovoranse 는 27°C LB 배지에서 배양하였으며 치주질환 병원균주인 *Prevotella intermedia* ATCC 25611 는 1 µg/ml menadione과 5 µg/ml hemin을 포함하고 있는 enriched tryptic soy agar를 이용하여 37°C 혐기성 조건(5% H₂, 5% CO₂, 90% N₂)에서 배양하였다.

항균활성

항균활성은 paper disc (φ 8mm)를 이용하여 disc diffusion 법(4)으로 측정하였다. 식중독 균주는 LB agar 배지에 24시간 배양한 균 100 µl를 도말한 후 목초액을 각 농도별로 흡수시킨 paper disc를 평판배지위에 놓고 균주의 배양조건에 따라 배양하여 disc 주위의 clear zone 직경으로 활성을 측정하였다.

전자공여능(Electron donation ability : EDA) 측정

전자공여능 측정은 Blois의 방법[3]에 따라서 각 추출물의 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 대한 수소공여 효과로 측정하였다. 추출시료를 DMSO에 녹여 농도별로 희석하여 시료 40 µl와 0.15 mM DPPH용액 160 µl를 섞은 후, 37°C에서 30분 동안 반응시킨 다음 ELISA reader를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능(Electron donating ability, EDA)은 EDA(%) = (대조구흡광도-시료첨가구흡광도)/대조구흡광도 × 100으로 계산하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조그룹과 흡광도차를 비교하여 프리라디칼의 제거활성을 백분율로 나타내었다.

SOD 유사활성(Superoxide dismutase -like activity : SODA) 측정

추출물의 SOD 유사활성은 Marklund 와 Marklund의 방법[17]에 따라 과산화수소(H₂O₂)로 전환시키는 반응을 촉매하는 pyrogallol의 생성량을 측정하여 SOD 유사활성으로 나타내었다. 각 추출시료를 DMSO에 녹여 농도별로 희석하여, 시료 10 µl에 pH 8.5로 보정한 Tris-HCl buffer (50 mM tris [hydroxymethyl] aminomethane, 10 mM EDTA, pH 8.5) 150 µl와 7.2 mM pyrogallol 10 µl를 첨가하여 25°C에서 10분간 반응 후 1 N HCl 50 µl를 가하여 반응을 정지시켰다. 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양은 ELISA reader를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성은 추출물 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

$$\text{SODA}(\%) = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

A : 추출물 첨가구의 흡광도, B : 추출물 무첨가구의 흡광도

NO Assay 및 cell viability 측정

NO의 생성은 비색법으로 세포 상층액에 축적되는 nitrite 양을 측정하였다. 대식세포를 세포 배양판에 5 × 10⁵ cells/

ml의 세포가 되도록 재부유하여 LPS의 자극하에 24시간 배양하고 그 배양 상층액 내의 NO를 Griess 시약과 반응시켜 측정하였다[15]. 100 µl의 세포배양 상층액을 취하여 동량의 Griess 시약 [1% sulfanilamide (30% acetic acid)와 0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (60% acetic acid) 혼합액] 을 가하여 상온에서 20분간 반응시켰다. NO의 활성 정도는 ELISA 판독기를 사용하여 800 µg/ml 농도 범위에서 540 nm 흡광도를 측정하였다.

세포활성은 MTT assay에 의하여 측정하였다[15]. 96-well microtiter plate (Nunc, Vangaard, Neptune, NJ)에 RAW 264.7 macrophage를 1 × 10⁵ cells/well의 농도로 분주하였다. 분주 24시간 후 각 추출물이 함유되어 있는 배지를 100 µl씩 넣어 48시간 동안 배양하였다. Plate에 MTT 2 mg/ml 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT, Sigma) 용액을 20 µl 씩 첨가하여 4시간 동안 배양시키고 formazan을 형성시킨 후 조심스럽게 상등액을 제거하였다. DMSO 150 µl를 첨가하여 formazan을 녹인 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출물의 농도는 희석하여(5 × 10⁻⁵ ~ 10⁻² µl/well) 사용 하였다.

결과 및 고찰

항균활성 측정

참나무 목초액을 5 ~ 50 µl까지의 농도로 식품부패균주인 *Escherichia coli*, *Proteus. vulgaris*, *S. aureus*, *Pseudomonas. oleovoranse* 및 치주질환 병원균주인 *Prevotella intermedia* ATCC 25611을 대상으로 미리 제조한 항균실험용 test plate에 점적한 후 항균활성을 조사한 결과는 Fig. 1A와 1B에 나타난 바와 같이 목초액 50 µl를 첨가하면 대부분의 실험균주에서 clear zone 형성되는 것으로 나타났다. 특히 치주질환균인 *Prevotella intermedia* 생육은 25 µl를 첨가에서도 현저히 저해되는 것으로 나타나 참나무 목초액이 치주질환 병원균주에 대해서 항균활성을 가지고 있는 것으로 나타났다. Kim 등 [10]은 주로 식품부패균 및 식중독균을 대상으로 목초액의 항균활성을 조사하였는데 그람양성균이 음성균에 비해 항균력이 높은 것으로 보고하였으며, Seo등[22]의 목초액 항균력 실험에서도 그람 음성균인 *Pseudomonas aeruginosa* 속이나 *E. coli* O-157등이 다른 그람양성균 *Salmonella typhimurium* 보다 목초액에 저항성을 보였다. 치주질환 병원균에 대한 연구는 Kim등[11]이 후박(*Magnoliae cortex*)에서 항균활성이 높은 것으로 보고하였다. 최근에 한약재 및 해조류 추출물을 중심으로 치주질환 원인균에 대한 항균활성물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

DPPH법에 의한 항산화활성측정

전자공여능이 시료의 flavonoid 및 polyphenol성 물질 등에 대한 항산화 작용의 지표로 알려져 있으며[23], 이러한 물

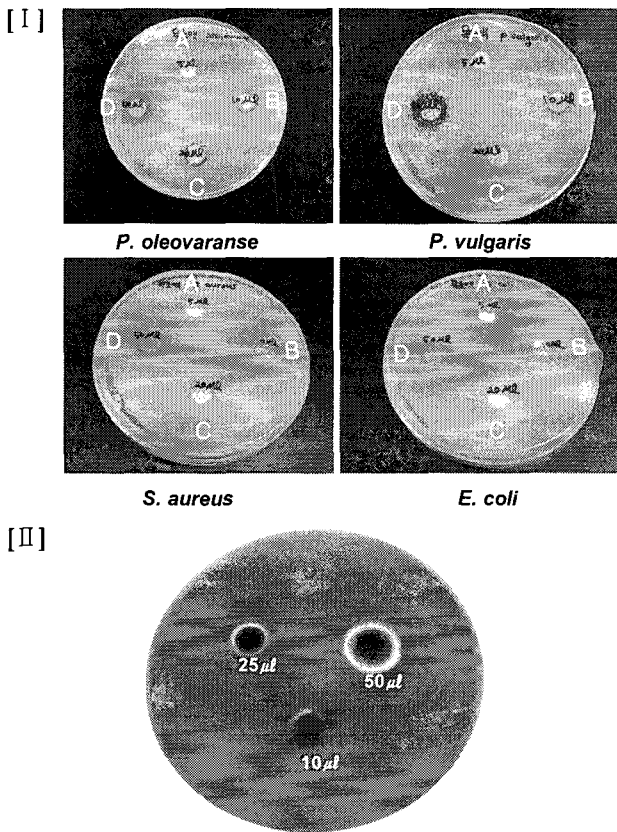


Fig. 1. Antimicrobial activities of oak smoke flavroing on the growth of food putrefaction and poisoning strains [I] and periodontal pathogen strain [II]. A, 5; B, 10; C, 20; D, 50 (μl/ml)

질들이 free radical을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 높다. 이러한 항산화물질은 활성 산소를 비롯한 다른 라디칼에 대한 소거 활성을 기대할 수 있으며 인체 내에서 free radical에 의한 노화를 억제 하는 척도로 이용할 수 있다[1]. 참나무 목초액의 자유기 소거능은 Fig. 2에 나타난바와 같이 목초액의 농도가 증가할수록 전자공여능이 증가하였고, 25 μl/ml농도에서 약 90%의 항산화효과를 나타내었다. 목초액의 항산화 활성에 대한 연구는 Jeong과 Shim이[9] 참나무 목초액 30 μl 농도에서 약 80% 라디칼 소거효과를 나타냈으며, Lee 등

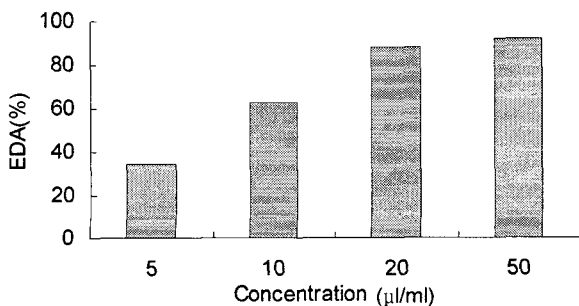


Fig. 2. Electron donating ability of oak wood vinegar.

[14]이 목초액의 항산화력은 주로 페놀성 분획에서 가장 높은 항산화 활성을 보고하였다. 본 실험에서도 비교적 낮은 농도에서 높은 항산화 효과를 나타내어 목초액을 천연 항산화활성제로 활용할 수 있는 가능성이 매우 높은 것으로 생각된다. 전자 공여능은 활성 라디칼에 전자를 공여하여 지방질의 산화억제 및 활성라디칼에 의한 노화를 억제하는 척도로 활용되고 있다.

SOD 유사활성(Superoxide dismutase like activity : SODA) 측정

참나무 목초액의 SOD 유사활성 측정 결과를 Fig. 3에 나타냈으며, SODA 측정 결과 추출물 농도가 증가할수록 항산화효과가 증가하였고, 50 μl/ml농도에서 약 65%의 항산화효과를 나타내었다. 이러한 결과는 비교적 항산화력이 높은 과일로 알려진 키위 착즙액의 SOD 유사활성(27.6%) 보다 2.5배 높은 SOD 유사활성을 나타내었다. Superoxide dismutase (SOD)는 항산화 효소로서 세포에 유해한 oxygen radical를 과산화수소 전환시키고 다시 catalase에 의하여 무해한 물분자와 산소분자로 전환시켜 활성산소로부터 생체를 보호하는 기능으로 알려져 있다[2]. SOD는 분자량이 비교적 큰 단백질로서 열이나 알칼리에 약하여 이러한 단점을 보완할 수 있는 저분자물질로 체내에서 역할이 유사한 SOD 유사활성 물질에 대한 연구가 진행되어 있다[20]. Nice 등[19]은 SOD 정제시 열안정성이 높고 SOD와 유사한 활성을 나타내는 물질을 함께 정제하였는데 이것은 SOD와 결합된 phenol계 물질인 것으로 보고하였다. 따라서 항산화 및 항노화와 밀접한 관계가 있는 것으로 알려진 SOD 유사활성 측정용 pyrogallol의 자동산화 반응을 이용하여 분석하였다.

NO Assay 및 cell viability

대장균 Bacterial lipopolysaccharise (LPS)를 대식세포에 처리하여 NO를 유도시킨 다음 참나무 목초액을 대식세포에 처리하여 NO 활성에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 4에 나타난바와 같이 LPS에 의하여 유도된 NO 활성은 참나무 목초액을 첨가함으로써 NO 활성이 86%까지 현저히 감소하였

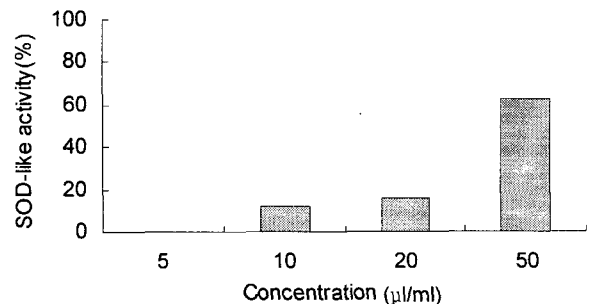


Fig. 3. Superoxide dismutase(SOD)-like activity of oak wood vinegar

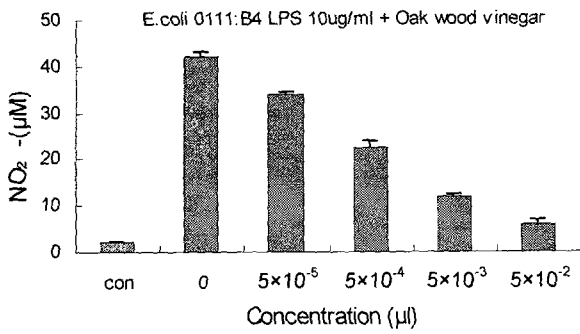


Fig. 4. Effects of the oak wood vinegar on NO synthesis in RAW264.7 cells stimulated with bacterial LPS. RAW264.7 cells were cultured for 24 h with various concentration in the presence of LPS. NO release was measured using the method of Griess (nitrite). Results are expressed as means±S.E. of three independent experiments.

다. 이러한 결과는 참나무 목초액이 면역기능과 관계가 있음을 나타내는 것이다. 일반적으로 암에 걸린 세포는 NO 활성이 증가하는데 항암제 등을 투여하면 NO 활성이 감소하는 것으로 알려져 있다.

세포활성은 Fig. 5에 나타낸바와 같이 MIT 분석을 통해서 측정하였다. LPS로 처리된 대식세포와 거의 같은 수준으로 참나무 목초액을 5 x 10² µl 까지 처리했을 때 세포독성이 없는 것으로 관찰되었다.

NO는 면역학적 방어에서 중요한 역할을 수행하고, 분비 조직과 세포의 기능에 영향을 미치며, 세포성 면역계의 주된 역할의 하나로 NO는 세포 독성이나 성장 억제 활성을 나타낸다[5]. NO는 L-arginine의 guanidino nitrogen으로부터 nitric oxide synthase(NOS)에 의하여 생성된다[8].

최근 항산화에 대한 관심이 증대 되면서 인공합성 항산화제를 대체할 천연항산화제의 개발에 많은 연구가 집중되고 있다. 대부분의 항산화연구가 약초를 중심으로 수행되어 왔지만 새로운 항산화제의 개발에도 많은 연구를 집중하고 있다. 최근 해양생물에 대한 관심이 고조되면서 주로 주식으로

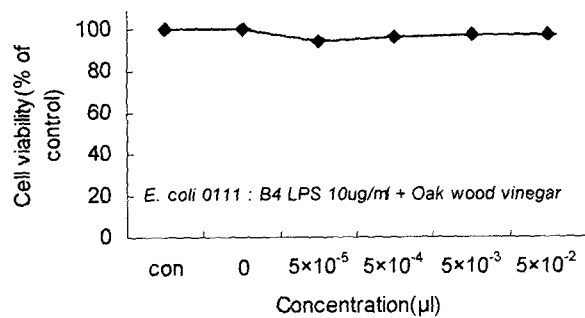


Fig. 5. Cytotoxic effect of oak wood vinegar on RAW264.7 cells. Values are mean with standard deviation of triplicate experiments.

이용되고 있는 해조류 즉 김, 미역, 다시마, 툫 및 파래 등에 대한 항산화 및 면역기능에 대한 많은 연구가 수행되고 있다.

NO는 대부분의 포유류 동물의 세포내에서 생성되고 신경계에서는 화학적 신호 전달 물질로서, 혈관계에서는 혈압 조절과 혈소판의 응집 및 호중성구의 집합 작용을, 골격근에서는 대사와 근 수축 조절 등 생리학적으로 중요한 역할을 한다. 최근 NO가 신경계의 생리학적 전달자로서 뿐만 아니라, 염증 반응, 면역계 및 세포 독성 외에도 세포의 분화나 세포 내 신호 전달 등의 중요한 조절 물질로 알려지고 있다. 또한 면역 세포에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 다량으로 외부의 자극에 의해 유전자 수준에서 발현되고 주로 침입한 미생물이나 종양 세포에 대해 독성을 갖는 방어 물질로서 작용하는 것으로 보고되고 있다[16,18]. 최근에 NO가 세포 활성화 물질 및 reactive oxygen intermediates(ROI)에 의해 유발된 세포 독성을 최소화시키는 역할이 밝혀짐으로 이 분야에 대해서 활발히 연구되고 있다.

요 약

참나무 목초액은 예로부터 농축산업에 이용되어 왔으며 최근에는 항균 및 항산화 효과가 있는 것으로 밝혀지면서 목초액에 대한 과학적인 연구가 활발히 진행되고 있다. 참나무 목초액의 항균 및 항산화 활성과 면역기능에 미치는 영향을 조사하였다.

참나무 목초액의 항균활성은 식품 부패균 및 치주질환 원인균에 대하여 항균활성을 조사하였는데 목초액 50 µl 첨가 시 대부분의 식품부패균 및 치주질환 원인균의 생육이 현저히 저해되었다.

참나무 목초액의 항산화력은 DPPH법에서 20 µl 첨가 시 95%의 라디칼 소거능을 보였으며 SOD 유사활성은 50 µl 첨가 시 65%의 항산화력을 나타내었다.

참나무 목초액의 항염증효과는 세균의 LPS를 처리하여 유도된 RAW264.7 세포에서 조사되었는데 LPS를 처리하여 유도된 NO 활성을 현저히 감소(86%)시켰으며 이 농도에서 세포독성 없이 높은 면역 효과를 나타내었다.

참 고 문 헌

1. An, B. J., J. T. Lee, J. H. Kwak, J. M. Park, J. Y. Lee and J. H. Son. 2004. Antioxidant effects and application as natural ingredients of Korean *Sanguisorbae officinalis*. L. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 47, 244-250.
2. Bannister, J. V., W. H. Bannister and G. Rotilio. 1987. Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase. CRC Crit. Rev. Biochem. 22, 111-180.
3. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable radical. Nature. 26, 1199-1200.
4. Dickson, J. S. 1992. Acetic acid action on beef-tissue surfa-

- ces contaminated with *Salmonella typhimurium*. *J. Food Sci.* **57**, 297-301.
5. Farias-Eisner, R., M. P. Sherman, E. Aeberhard and G. Chaudhuri. 1994. Nitric oxide is an important mediator for tumoricidal activity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 9407-9411.
 6. Guillen, M. D. and M. L. Ibargoitia. 1998. New components with potential antioxidant and organoleptic properties, detected for the first time in liquid smoke flavoring preparations. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 1276-1285.
 7. Guillen, M. D. and M. J. Manzanos. 1996. Study on the components of an aqueous smoke flavoring by means of Fourier transform infrared spectroscopy and gas chromatography with mass spectrometry and flame ionization detectors. *Adv. Food Sci.(CTML)* **18**, 121-127.
 8. Ignarro, L. J., J. M. Fukutto, J. M. Griscavage, N. E. Rogers and R. E. Byrns. 1993. Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrite: Comparison with enzymatically formed nitric oxide form L-arginine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 8103-8107.
 9. Jeong, C.-H. and K.-H. Shim. 2002. Nitrite-scavenging and antioxidant activities of wood vinegar. *Korean J. Food Preservation* **9**, 351-355.
 10. Kim, J.-S., S.-W. Park, Y.-S. Ham, S.-K. Jung, S.-H. Lee and S.-K. Chung. 2005. Antimicrobial activities and phenolic compounds of pyroligneous liquor. *Korean J. Food Preserv.* **12**, 470-475.
 11. Kim, T.-I., E.-J. Choi, C.-P. Chung, S.-B. Han and Y. Ku. 2002. Antimicrobial effect of *Zea mays* L. and *Magnoliae cortex* extract mixtures on periodontal pathogen and effect on human gingival fibroblast cellular activity. *Korean Acad. Periodontol.* **32**, 249-255.
 12. Kim, Y.-H., S.-K. Kim, K.-S. Kim, and Y.-H. Yun. 2001. Composition of constituents of commercial wood vinegar liquor in Korea. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **44**, 262-268.
 13. Lee, J.-E., J.-H. Hong, K.-W. Chang and J.-Y. Hwang. 2005. Effect of pyroligneous acid liquor on the maturity of pig manure compost. *Korean J. Soil Sci. Fert.* **38**, 101-107.
 14. Lee, K.-M., G.-T. Jeong and D.-H. Park. 2004. Study of antimicrobial and DPPH radical scavenger activity of wood vinegar. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **19**, 381-384.
 15. Lin, H.-Y., S.-H. Juan, S.-C. Shen, F. L. Hsu and Y. C. Chen. 2003. Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by flavonoids in RAW264.7 macrophages involves heme oxygenase-1. *Biochemical Pharmacology* **66**, 1821-1832.
 16. Marletta, M. A. 1993. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* **268**, 12231-12234.
 17. Marklund, S., G. Marklund. 1975. Involvement of superoxide aminoradical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*, **47**, 468-474.
 18. Nathan, C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**, 3051-3064.
 19. Nice D. J., D. S. Robinson and M. A. Jolden. 1995. Characterization of a heat-stable antioxidant co-purified with the superoxide dismutase activity from dried peas. *Food Chem.* **52**, 393-397.
 20. Pryor, W. A. 1986. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. *Ann. Rev. Physiol.* **48**, 657-667.
 21. Pszczola, D. E. 1995. Tour highlights production and uses of smoke-based flavors. *Food Technol.* **49**, 70-74.
 22. Seo, K.-I., K.-J. Ha, Y.-I. Bae, J.-K. Jang and K. H. Shim. 2000. Antimicrobial activities of oak smoke flavoring. *Korean J. Postharvest Sci. Technol.* **7**, 337-341.
 23. Torel, J., J. Gillard and P. Gillard. 1986. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry.* **25**, 383-385.