

19종 시판 탄화초액의 항산화활성의 평가 및 비교

김성필¹ · 남석현^{2*}

¹이주대학교 분자과학기술학과, ²이주대학교 생명과학과

Evaluation and Comparison of Antioxidant Activities of Nineteen Commercial Carbonated Vinegar Liquors

Sung Phil Kim¹ and Seok Hyun Nam^{2*}

¹Department of Molecular Science and Technology, Ajou University, Suwon 443-749, Korea

²Department of Biological Science, Ajou University, Suwon 443-749, Korea

Received August 24, 2009; Accepted December 3, 2009

Biological functionality of nineteen commercially available carbonated vinegar liquors including wood vinegar liquor (WVL), bamboo vinegar liquor (BVL) and chaff vinegar liquor (CVL) were evaluated, focusing mainly on electron donating ability to DPPH radical, reducing power against ferricyanide (Fe³⁺), blockading ability to linoleic acid autoxidation and NO production from LPS-stimulated RAW264.7 cells plus cytotoxicity to RAW264.7 cells. The results showed that crude carbonated vinegar liquors, regardless of their source materials, have high capacity of antioxidation such as electron donating ability, reducing power, blockading ability to lipid peroxidation and NO production, as well as cell cytotoxicity. Refined carbonated vinegar liquors for skin care or bath showed significantly low cell cytotoxicity, however, overall antioxidant potencies were also low. Especially, these carbonated vinegar liquors revealed low levels of inhibition for NO production deeply involved in inflammation. Among nineteen carbonated vinegar liquors examined, chaff vinegar liquor was observed to be the most potent carbonated vinegar liquor with high antioxidant activities together with low cytotoxicity to mammalian cells.

Key words: antioxidation, carbonated vinegar liquor, cytotoxicity, functionality

서 론

탄화초액이란 목재나 죽재, 또는 벼 도정부산물인 왕겨 등을 탄화시키는 과정에서 발생하는 연기를 냉각하여 얻은 응축액을 말하여, 목재, 죽재 및 왕겨를 탄화재료로서 사용한 것을 각각 목초액, 죽초액, 왕겨초액으로 부른다. 탄화초액은 탄화과정에서 발생하는 응축물을 증분리하여 경질유인 상층액과 하층의 타르를 제거하고 중간 수용액층을 조탄화초액으로 제조하는 비슷한 과정으로 만들어진다[Ikeshima, 1987; Kim 등, 1999]. 목초액은 대부분 수분에 유기산류, 페놀류 등 200여종의 화합물을 포함한 산도 3-4정도의 복합물로서[Kim 등, 2001], 성분은 원료인 목재의 수종이나 탄화조건에 따라 변한다[Maga와 Chen, 1985; Guillen과 Ibargoitia, 1999]. 목초액의 용도 및 활성에 대해서는 항균 및 보존성 향상, 작물 병의 방제, 가축기금의 육

질개선 등을 중심으로 연구되었고[Jeong과 Shim, 2002; Kim 등, 2003; Youn 등, 2005; Geon 등, 2005; Kim과 Kim, 2007], 항암효과 및 지질대사 개선효과 등 건강기능성에 대한 연구 결과도 보고되었다[Park 등, 2003; Kim 등, 2004; Jeong 등, 2007; Cho와 Choi, 2007]. 또한 식품과 의용소재로의 응용이 시도되지만, 독성 및 발암유도 가능성에 대해서는 심도 있게 더 검토되어야 할 것으로 본다. 그러나 탄화초액은 향후 천연항산화제와 같은 기능성물질의 개발 등 응용범위가 확대될 수 있는 소재라고 생각된다.

따라서 본 연구에서는 농업용에서부터 목욕용, 피부 관리용으로 시판되는 19종의 탄화초액을 선택하여 전자공여활성, 환원력, 지질과산화 억제활성, NO 생성 억제활성의 항산화활성과 포유동물 세포에 대한 세포독성을 측정 비교함으로써 각 제품의 용도와 기능성의 관계를 조사하였다.

*Corresponding author
Phone: +82-31-219-2619; Fax: +82-31-219-1615
E-mail: shnam@ajou.ac.kr

재료 및 방법

시약 및 재료. *E. coli* 유래의 lipopolysaccharide(LPS), sodium nitrite, potassium ferricyanide, linoleic acid, DPPH

(1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) 등 실험에 필요한 analytical grade의 화학시약은 모두 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO)에서 구입하여 별도의 정제과정 없이 사용하였다. 부산물 탄화초액은 현재 시판중인 19종류의 상품을 수집하여 사용하였다. 죽초액(BVL; Bamboo Vinegar Liquor)으로는 죽림식품(전라남도 담양읍)에서 죽향(BVLI)과 죽의 신비(BVLII)와 4배 농축 대나무 목초액(BVLIII), 숲이야기(강원도 춘천시)의 목욕용 죽초액(BVLIV), 대나무 건강나라(전라남도 담양군)의 바레죽초(BVLV) 및 농업용 죽초액(BVLVI)과 죽청(BVLVII), 그리고 대나무바이오택(전라남도 담양읍)의 죽미인(BVEVIII)을 구입하였다. 목초액(WVE; Wood Vinegar Liquor)은 생활참숯(강원도 횡성읍)의 참향 골드(WVLI)와 아토119(WVLII), 정제목초액(WVLIII)을, 숲이야기의 목욕용 목초액(WVLIV)과 정제목초액(WVLV), 목초액 원액(WVLVI)을, 강원 목초산업(강원도 영월군)의 강원 목초액(WVLVII)을, 그리고 좋은 참숯(서울시 문정동)제품의 목욕용 목초액(WVLVIII)과 농업용 목초액(WVLIX), 유아용 목초액(WVLX)을 구입하였다. 왕겨초액(CVL; Chaff Vinegar Liquor)은 대원 GSI(경상북도 왜관읍) 제품을 사용하였다.

세포 배양. 마우스 대식세포주인 RAW264.7세포는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA)에서 구입하였다. RPMI 1640 배지, fetal bovine serum(FBS) 및 Hank's balanced salt solution(HBSS) 및 배지에 첨가하는 항생물질은 모두 Hyclone(Logan, UT)의 제품을 구입하여 사용하였으며, 10% FBS와 100 unit의 penicillin과 streptomycin이 함유된 RPMI 1640 배지를 사용하여 5% CO₂를 함유하는 37°C 포화습도 공기조건에서 배양하였다.

DPPH 자유라디칼에 대한 전자공여활성 측정. 전자공여능의 측정은 Blois의 방법에 따라 측정하였다[1958]. 즉, 에탄올 1 mL, 적당량의 시료와 100 mM 초산완충액(pH 5.5) 990 μ L를 분주한 시험관에 에탄올에 용해한 0.5 mL의 0.5 mM DPPH 용액을 첨가하여 교반하고 30초 간 반응을 유도한 후 잔존 radical의 농도를 517 nm에서 측정하였다. 전자공여능(%)은 [(1-As/Ac) \times 100]으로 산출하였고, As와 Ac는 각각 실험군과 대조군의 흡광도를 대입하였다.

환원력 측정. 환원력은 Oyaizu의 방법에 따라 측정하였다[1986]. 50 mM 인산완충액(pH 6.6)으로 시료에 0.5 mL의 50 mL potassium fericyanide [K₃Fe(CN)₆]에 첨가하고 50°C에서 30분 간 반응하였다. 반응 후 0.5 mL의 10% trichloroacetic acid를 첨가하고 3,000 rpm의 원심분리로 상층액만을 회수하였다. 회수된 상층액 0.5 mL에 동일한 양의 탈이온수와 0.1 mL의 FeCl₃를 첨가한 다음, UV/vis spectrophotometer(V-550, Jasco, Tokyo, Japan)을 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 시료 대신 동일한 농도의 α -tocopherol을 첨가한 것을 사용하였다.

Nitric oxide(NO) 생산 억제활성 측정. NO 생산량은 Murakami 등의 방법으로 측정하였다[1999]. RAW264.7 세포를 96-well plate에서 well 당 1×10^5 cells를 분주한 다음, 적당량의 시료와 100 ng/mL의 LPS(lipopolysaccharide)를 세포배양 well plate에 첨가하여 37°C, 5%의 CO₂를 함유한 포화습도의 공기조건에서 48시간 배양하였다. 대조구로는 100 ng/mL의 LPS

(lipopolysaccharide)만을 처리한 세포를 사용하였다. 배양이 끝나면, 배양액 100 μ L를 회수하여 동량의 Griess solution을 첨가하여 15분간 방치한 다음, 배양액의 발색도를 microplate reader(Model 550, Bio-Rad, Hercules, CA)를 사용하여 570 nm 및 650 nm의 흡광도로 측정하였다. 세포가 생산한 NO의 양은 nitrite의 양으로 정량하였고 sodium nitrite를 사용한 표준곡선에 의하여 생산량을 계산하였다.

MTT 검정. MTT colorimetric reduction assay로 시료가 세포 생존율에 미치는 영향을 Mosmann의 방법으로 측정하였다[1983]. RAW264.7 세포를 96-well plate에 NO 측정과 동일하게 이식한 다음 24시간 배양하고 적당량의 시료를 첨가한 후, 배양액에 mg/mL의 MTT 용액(Sigma Chemicals)을 50 μ L 첨가하고 37°C에서 3시간 반응하였다. 그 다음, 150 μ L의 DMSO를 사용하여 10분간의 진탕으로 세포에 들어간 formazan 색소를 충분히 용출시켰다. 색소의 용출 정도는 microplate reader를 사용하여 570 nm와 690 nm의 흡광도로 정량하였다. 세포독성은 시료 무처리군에 대한 시료 처리군의 백분율로서 세포 생존율을 나타내었다.

지질과산화 억제효과 측정. 지질과산화 억제효과는 Siddhuraju와 Becker의 방법에 따라 수행하였다[2007]. 즉, Tween 20이 포함된 0.2 M 인산완충액(pH 7.0)에 용해시켜 제작한 20 mM

Table 1. Electron donating abilities of various commercial carbonated vinegar liquors to DPPH radical

Sample	Electron donating ability (%)		
	0.5%(v/v)	1%(v/v)	
Control	0.00 \pm 0.52 ⁿ	0.00 \pm 0.52 ^k	
BHT	85.06 \pm 2.98 ^{aa*}	91.81 \pm 4.56 ^{a**}	
BVL	I	76.21 \pm 1.40 ^f	83.05 \pm 0.59 ^{fi}
	II	60.26 \pm 1.68 ^j	76.14 \pm 2.17 ^h
	III	90.40 \pm 0.61 ^a	96.91 \pm 9.24 ^b
	IV	83.46 \pm 1.71 ^e	85.25 \pm 0.22 ^{bcd}
	V	87.37 \pm 0.60 ^b	88.26 \pm 0.42 ^{bcd}
	VI	86.60 \pm 0.28 ^{bc}	87.34 \pm 0.04 ^{bcd}
	VII	70.37 \pm 1.00 ^g	83.84 \pm 0.63 ^{def}
	VIII	62.69 \pm 1.60 ⁱ	82.72 \pm 0.23 ^{ef}
WVL	I	65.00 \pm 2.13 ^h	79.54 \pm 0.35 ^{gi}
	II	45.87 \pm 0.93 ^k	72.48 \pm 1.84 ^b
	III	85.75 \pm 0.56 ^{bcd}	86.48 \pm 0.56 ^{bcd}
	IV	77.14 \pm 0.81 ^f	84.39 \pm 0.64 ^{cdef}
	V	84.11 \pm 0.30 ^{de}	87.02 \pm 0.54 ^{bcd}
	VI	86.88 \pm 0.67 ^{bc}	90.01 \pm 0.81 ^b
	VII	86.31 \pm 0.85 ^{bc}	89.36 \pm 1.19 ^{bc}
	VIII	18.12 \pm 0.31 ^l	36.10 \pm 3.72 ^j
	IX	85.18 \pm 0.25 ^{cd}	86.51 \pm 0.71 ^{bcd}
	X	15.04 \pm 1.74 ^m	27.77 \pm 4.64 ^j
CVL	79.39 \pm 0.33 ^{ef}	82.13 \pm 0.10 ^{ef}	

BVL: Bamboo Vinegar Liquor; WVL: Wood Vinegar Liquor; CVL: Chaff Vinegar Liquor

* and ** indicate final concentration of BHT at 10 μ M and 100 μ M, respectively.

Results are expressed as mean \pm SD (n=3).

Values within each column with the same superscript are not significantly different at $p < 0.05$.

linoleic acid emulsion 2.5 mL에 적당량의 시료와 0.2 M 인산 완충액(pH 7.0) 2 mL을 혼합한 후 40°C water bath에서 12시간 및 24시간 반응을 유도하였다. 반응이 종료되면 반응액 0.1 mL에 75% ethanol 4.7 mL, 30% ammonium thiocyanate 용액 0.1 mL을 넣고 3.5% HCl에 용해시킨 0.02 M FeCl₂ 용액 0.1 mL을 첨가하여 실온에서 3분 간 반응액을 발색시킨 다음, 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 시료 대신에 linoleic acid emulsion만을 첨가한 것과 시료 대신 BHT를 첨가한 것을 사용하였으며, 지질과산화에 대한 시료의 억제능은 [(1-As/Ac) × 100]으로 산출하였고, As와 Ac는 각각 실험군과 대조군의 흡광도를 대입하였다.

통계분석. 3회 이상의 반복실험에서 얻어진 실험결과는 Statistical Analysis System(SAS) software package version으로 분석하였다. 실험의 평균값은 mean±SD로 표시하였으며 실험군과 대조군, 그리고 반복실험으로 얻어진 실험군 사이의 평균값의 유의적 차이는 Duncan's multiple range test에 의하여 검증하였고, $p < 0.05$ 수준에서 평균값 사이의 유의적 차이를 구하였다.

결과 및 고찰

탄화초액의 전자공여활성. 죽초액, 목초액, 왕겨초액의 DPPH 라디칼에 대한 전자공여활성을 측정된 결과(Table 1), 1% 탄화초액 처리조건에서 WVLVIII과 WVLX를 제외하면 모두 72%

Table 2. Reducing powers of various commercial carbonated vinegar liquors

Sample	absorbance at 700 nm		
	0.008%(v/v)	0.016%(v/v)	
Control	0.023±0.004 ^m	0.023±0.004 ^o	
α-tocopherol	1.524±0.067 ^{ef}	1.892±0.223 ^{ef}	
BVL	I	0.882±0.043 ⁱ	1.159±0.010 ^h
	II	0.561±0.021 ^k	0.843±0.038 ^{jk}
	III	2.635±0.067 ^a	2.613±0.038 ^a
	IV	1.081±0.055 ^h	1.403±0.020 ^g
	V	1.709±0.010 ^e	2.142±0.031 ^c
	VI	1.307±0.067 ^g	1.657±0.056 ^f
	VII	0.632±0.002 ^{jk}	0.962±0.039 ^j
	VIII	0.558±0.006 ^k	0.779±0.022 ^k
WVL	I	0.286±0.002 ^l	0.602±0.007 ^l
	II	0.301±0.004 ^l	0.523±0.011 ^m
	III	1.822±0.053 ^d	2.032±0.054 ^{de}
	IV	0.652±0.011 ^j	0.864±0.011 ^j
	V	1.503±0.102 ^f	1.713±0.021 ^f
	VI	2.351±0.082 ^b	2.533±0.051 ^b
	VII	1.692±0.031 ^e	1.986±0.100 ^e
	VIII	0.045±0.003 ^m	0.134±0.007 ⁿ
	IX	1.763±0.042 ^{de}	2.096±0.037 ^{cd}
	X	0.032±0.002 ^m	0.130±0.005 ⁿ
CVL	1.983±0.013 ^c	2.343±0.072 ^c	

BVL: Bamboo Vinegar Liquor; WVL: Wood Vinegar Liquor; CVL: Chaff Vinegar Liquor

Results are expressed as mean±SD (n=3).

Values within each column with the same superscript are not significantly different at $p < 0.05$.

이상의 높은 전자공여활성을 보였다. BLVIII나 WVLVI와 같이 농축액 또는 정제되지 않은 원액에서 90% 이상의 전자공여활성을 보였지만, 정제 탄화초액들도 80% 이상의 우수한 전자공여활성이 발견되었다. 영유아의 피부 처리용인 WVLII와 WVLX는 같은 용도에도 불구하고 전자공여활성에서 많은 차이를 보였다(1%처리에서 각각 72.5%와 27.8%).

탄화초액의 환원력. 시료가 Fe³⁺를 Fe²⁺로 변환시키는 환원력을 측정하여 또 다른 항산화활성의 지표로 평가하였다(Table 2). 전자공여활성 측정실험과 비교하여 매우 낮은 처리농도에서도 시료는 뚜렷한 환원력을 보였고 시료별 환원력 양상은 대체로 전자공여활성과 비슷한 경향을 보였다. 그러나 WVLIX와 CVL은 환원력이 전자공여활성보다 우수한 반면, WVLIV는 이와 반대되는 현상을 보였다.

시료에 의한 Fe이온의 착화가 환원력의 측정값에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Fe이온에 대한 시료의 착화능(chelating activity)을 측정하였으나, 시료의 착화능이 환원력에 의한 시료의 항산화활성 평가에 큰 영향을 가져오지 않는다는 결과를 얻었다(Table 3).

지질과산화에 대한 억제활성. 막지질의 산화로 생성되는 지질과산화물이 세포의 노화 및 유전물질의 손상에서의 중요성이 알려져 있기 때문에, 탄화초액의 지질 자동산화반응에 대한 억제활성을 linoleic acid 자동산화 시스템을 이용하여 측정된 결과(Table 4), 대다수의 탄화초액은 항산화제인 BHT(200 μM)를 처리한 대조군과 비슷한 수준의 저해활성을 보였으나 전자공여

Table 3. Ferrous ion chelating activities of various commercial carbonated vinegar liquors

Sample	chelating ability (%)		
	0.008%(v/v)	0.016%(v/v)	
Control	0.00±1.32 ^{jk}	0.00±1.32 ^h	
BVL	I	6.59±1.93 ^{fg}	8.61±0.85 ^{ef}
	II	1.00±1.93 ^{de}	13.28±1.13 ^{cd}
	III	16.81±1.42 ^h	19.42±1.70 ^h
	IV	1.95±1.42 ^{ji}	3.45±0.85 ^g
	V	8.45±1.07 ^{ef}	12.54±0.74 ^{cd}
	VI	3.19±1.42 ^{ghij}	5.66±1.86 ^{fg}
	VII	-3.01±4.64 ^k	-2.69±1.47 ^{hi}
	VIII	-0.84±1.42 ^{jk}	1.73±1.47 ^h
WVL	I	10.05±0.53 ^{cd}	18.89±1.90 ^h
	II	6.39±1.40 ^{fg}	12.49±2.42 ^{cde}
	III	4.26±1.90 ^{ghi}	14.63±1.83 ^c
	IV	-0.62±0.92 ^{jk}	-0.01±2.79 ^h
	V	1.52±1.90 ^{ji}	4.26±0.92 ^g
	VI	21.64±1.40 ^a	26.22±2.42 ^a
	VII	5.18±0.92 ^{ghi}	10.05±0.92 ^{de}
	VIII	9.75±2.42 ^{de}	13.71±2.42 ^{cd}
	IX	3.96±0.92 ^{ghij}	5.79±0.92 ^{fg}
	X	8.83±0.92 ^{ef}	15.236±1.06 ^c
CVL	-7.34±2.34 ^l	-4.41±1.86 ⁱ	

BVL: Bamboo Vinegar Liquor; WVL: Wood Vinegar Liquor; CVL: Chaff Vinegar Liquor

Results are expressed as mean±SD (n=3).

Values within each column with the same superscript are not significantly different at $p < 0.05$.

Table 4. Inhibitory effect of various commercial carbonated vinegar liquors on linoleic acid peroxidation

Sample	Lipid peroxidation inhibition (%)		
	after 12 h	after 24 h	
Vehicle	0.00±0.00 ⁱ	0.00±0.00 ⁿ	
BHT (200 µM)	78.28±0.36 ^a	78.05±0.07 ^a	
BVL	I	65.89±1.24 ^e	65.39±0.17 ^g
	II	44.87±1.43 ^g	35.05±1.65 ^k
	III	77.93±3.13 ^a	73.36±0.27 ^{cd}
	IV	76.80±1.28 ^{abc}	76.10±0.47 ^b
	V	76.18±0.45 ^{abc}	76.00±0.51 ^b
	VI	77.60±1.36 ^{ab}	75.73±0.77 ^b
	VII	74.96±0.66 ^{cd}	72.42±0.33 ^{de}
	VIII	74.99±0.35 ^{cd}	73.61±0.80 ^{cd}
WVL	I	77.11±1.31 ^{abc}	68.88±0.75 ^f
	II	72.59±0.42 ^d	53.62±1.04 ⁱ
	III	76.72±1.28 ^{abc}	71.44±0.21 ^e
	IV	77.37±1.64 ^{abc}	72.32±0.14 ^{de}
	V	74.94±1.07 ^{cd}	62.07±0.80 ^h
	VI	56.63±1.76 ^f	40.60±0.55 ^j
	VII	74.88±0.77 ^{cd}	74.00±1.24 ^c
	VIII	41.67±1.34 ^h	19.89±1.36 ^m
	IX	67.99±0.92 ^e	65.64±0.83 ^g
	X	39.92±1.46 ^h	30.35±0.45 ^l
CVL	75.24±0.45 ^{bc}	72.83±0.51 ^{cde}	

BVL: Bamboo Vinegar Liquor; WVL: Wood Vinegar Liquor; CVL: Chaff Vinegar Liquor

Results are expressed as mean±SD (n=3).

Values within each column with the same superscript are not significantly different at $p < 0.05$.

활성이나 환원력이 낮은 탄화초액은 지질과산화 억제활성도 낮게 나타나는 경향이 있었다(WVLVIII, WVLX). 특히 왕겨초액은 지질과산화 억제활성이 비교적 장시간 지속되는 탄화초액 중의 하나임을 알 수 있었다(CVL).

일산화질소(NO) 생산 억제활성 및 세포독성. 세포의 NO 생산에 대한 탄화초액의 억제활성을 측정된 결과(Table 5), 1%의 탄화액 처리에서 왕겨초액의 억제활성이 가장 높았다(92.1% 억제). 일반적으로 정제되지 않은 탄화초액들의 활성이 정제 탄화초액의 활성에 비하여 높게 나타나는 경향도 발견되었다(BVLVI, WVLVI, WVLVII, WVLIX, WVLIII, WVLV).

본 실험에서 NO 공급원은 활성화 대식세포로서, 탄화초액의 세포독성이 NO 생산 양상에 영향을 줄 수 있기 때문에, 지시세포에 대한 시료의 세포독성을 측정하였다(Table 6). 그 결과, 1%의 처리군에서 7종의 탄화초액이 BVLIII>WVLVII>WVLVI>BVLV>WVLIII>WVLV>WVLIX의 순서로 높은 세포독성을 보였다. 따라서 이들 탄화초액의 NO 생성억제활성은 지시세포의 사멸 때문일 가능성이 높기 때문에 이들 시료들이 보이는 억제활성을 세포 내 NO생성 경로에 대한 특이적인 억제작용이나 직접적인 NO소거의 결과로는 볼 수 없다. 그러나 농업용 죽초액(BVLVI)와 왕겨초액(CVL)은 세포독성이 높지 않은 것으로 볼 때, NO 생산을 억제하거나 소거하는 활성이 있다고 보여지며, 특히 왕겨초액이 NO 억제에 있어서 특히 우수하게

Table 5. Modulatory effect of various commercial carbonated vinegar liquors on NO production induced by LPS stimulation in RAW264.7 cells

Sample	µM of nitrite (% of inhibition)		
	0.5%(v/v)	1%(v/v)	
Control (-LPS)	4.846±0.065 (100.0 ^a)	4.846±0.065 (100.0 ^b)	
Control (+LPS)	38.629±0.674 (0.0 ^b)	38.629±0.674 (0.0 ^b)	
BVL	I	28.367±0.531 (26.6 ^b)	20.427±0.515 (47.1 ⁱ)
	II	30.652±1.700 (20.7 ^b)	26.232±0.425 (32.1 ^k)
	III	25.596±0.892 (33.7 ^{gh})	22.037±0.828 (43.0 ^j)
	IV	22.150±0.395 (42.7 ^f)	14.285±0.639 (63.0 ^g)
	V	12.974±0.343 (66.4 ^e)	8.517±0.490 (78.0 ^f)
	VI	9.790±0.566 (74.7 ^c)	5.970±1.062 (84.5 ^{bc})
	VII	22.300±1.816 (42.3 ^g)	13.610±1.238 (64.8 ^g)
	VIII	24.360±0.810 (36.9 ^{gh})	17.768±0.619 (54.0 ^h)
WVL	I	29.715±0.789 (23.1 ^{hi})	25.521±1.201 (33.9 ^k)
	II	32.787±0.490 (15.1 ^j)	29.453±0.172 (23.8 ^{kl})
	III	8.142±0.172 (78.9 ^b)	6.906±0.324 (82.1 ^{cd})
	IV	23.873±1.191 (38.2 ^e)	7.543±0.982 (80.5 ^{ef})
	V	7.243±0.395 (81.2 ^b)	6.869±0.234 (82.2 ^{kl})
	VI	7.431±0.130 (80.8 ^b)	7.243±0.172 (81.2 ^{def})
	VII	11.850±0.395 (69.3 ^d)	8.067±0.297 (79.1 ^{ef})
	VIII	36.345±1.626 (5.9 ^k)	30.914±1.637 (20.0 ^l)
	IX	8.592±0.908 (77.8 ^c)	7.730±0.389 (80.0 ^{de})
	X	33.685±1.545 (12.8 ^j)	32.225±1.011 (16.6 ^m)
CVL	7.918±0.619 (79.5 ^b)	3.049±0.259 (92.1 ^a)	

BVL: Bamboo Vinegar Liquor; WVL: Wood Vinegar Liquor; CVL: Chaff Vinegar Liquor

Results are expressed as mean±SD (n=3).

Values within each column with the same superscript are not significantly different at $p < 0.05$.

작용한다는 사실을 발견할 수 있었다.

탄화초액은 목재나 죽재, 왕겨의 탄화과정에서 생성된 연기를 냉각시켜 만든 조탄화초액을 충분히하여 직접 얻은 농업용 내지 생활용 탄화초액과 이를 다시 감압증류분리에 의하여 식용 또는 의료용의 정제 탄화초액으로 용도를 구분할 수 있다 [Park 등, 2003]. 그러나 알려진 용도에 적합한 기능성의 보유 여부는 과학적으로 평가될 필요성이 있다. 목초액이 스모그향 (smoke flavor)의 이름으로 일부 식품으로 사용되지만, 탄화초액을 식용이나 의료용으로 응용하려면 독성 등 체계적인 연구가 요구된다 [Jeong과 Shim, 2002]. 따라서 본 연구에서는 각종 시판 부산물 탄화초액의 전자공여활성, 환원력, NO 생성 억제활성의 항산화활성과 포유동물세포에 대한 독성의 두 가지 생물학적 기능성에 주목하여 제품 간, 탄화원료 간의 차이를 비교평가하였다. 농업용 내지 일반 생활용 탄화초액은 항산화효과를 우수한 반면, 세포독성은 매우 강한 경향을 보였지만, 같은 용도에서도 세포독성이 낮으면서도 항산화성이 높은 제품도 관찰되어, 제조방법에 대한 비교 및 검토가 수행될 필요가 있다(BVLVI). 아토피 등 피부질환 개선용으로 개발된 제품들은 세포독성은 없었지만 대체로 낮은 NO 생성 억제활성을 보였다. NO가 혈관 평활근의 이완을 통한 혈관 확장 및 혈소판 응집, 호중구의 집합유도 등 염증반응의 유도과 관련된 작용을 수행할 뿐 아니라 [Nathan, 1992], 또 다른 활성산소종인 superoxide

Table 6. Cytotoxicity of various commercial carbonated vinegar liquor in RAW264.7 cells

Sample	Cell viability (%)					
	0.01%(v/v)	0.05%(v/v)	0.1%(v/v)	0.5%(v/v)	1%(v/v)	
Control	100.00±0.75 ^a	100.00±0.75 ^a	100.00±0.75 ^a	100.00±0.75 ^a	100.00±0.75 ^a	
BVL	I	98.33±3.61 ^a	99.48±1.24 ^a	97.23±1.54 ^{abcd}	99.20±0.14 ^{ab}	91.97±1.58 ^c
	II	100.13±0.08 ^a	99.56±1.13 ^a	99.09±0.76 ^a	96.80±0.73 ^{abc}	95.64±1.70 ^b
	III	100.11±0.29 ^a	99.57±1.03 ^a	52.30±5.66 ^j	32.81±1.27 ^k	12.65±1.27 ^k
	IV	99.38±0.68 ^a	98.00±0.23 ^{abc}	98.00±0.50 ^{abc}	98.29±0.99 ^{ab}	92.77±1.47 ^{bc}
	V	98.97±0.58 ^c	95.34±2.68 ^{ghi}	94.96±3.93 ^{cde}	93.01±1.06 ^{de}	40.46±1.39 ^h
	VI	99.03±0.70 ^a	93.64±1.95 ^{hi}	94.91±0.86 ^{cde}	94.17±1.05 ^{cde}	87.19±2.31 ^d
	VII	99.49±1.17 ^a	93.12±1.03 ^{hi}	96.69±1.04 ^{abcde}	94.02±1.72 ^{cde}	93.36±0.46 ^{bc}
	VIII	98.91±1.49 ^a	95.99±0.41 ^{cde}	94.65±0.26 ^{cde}	95.91±3.71 ^{bcd}	91.60±2.43 ^c
WVL	I	99.89±0.63 ^a	99.37±0.47 ^a	98.88±2.18 ^{ab}	98.72±0.31 ^{ab}	99.30±0.57 ^a
	II	98.96±0.77 ^a	94.50±1.67 ^{def}	93.95±0.76 ^{de}	93.59±0.42 ^{cde}	92.08±2.84 ^c
	III	99.04±0.37 ^a	98.09±0.90 ^{abc}	83.79±1.63 ^h	70.19±3.39 ^h	50.64±1.03 ^g
	IV	98.62±0.50 ^a	96.72±0.55 ^{bcd}	95.25±2.11 ^{bcd}	84.58±1.75 ^f	76.59±3.09 ^e
	V	98.70±1.17 ^a	98.49±1.31 ^{ab}	87.73±0.92 ^{de}	78.86±1.63 ^g	60.46±0.37 ^f
	VI	98.60±0.31 ^a	96.41±1.19 ^{bcd}	84.75±2.25 ^{hi}	61.38±2.54 ^h	32.36±2.99 ^j
	VII	90.00±0.61 ^c	84.69±0.61 ⁱ	80.20±0.83 ⁱ	58.06±1.84 ^j	27.64±2.13 ^j
	VIII	98.26±1.10 ^a	95.96±0.43 ^{cde}	93.33±0.68 ^{de}	96.61±1.96 ^{bc}	91.65±1.76 ^c
	IX	93.98±0.65 ^h	91.52±0.36 ^h	88.80±0.26 ^g	82.48±2.53 ^f	62.60±2.26 ^f
	X	94.29±0.99 ^b	94.39±1.57 ^{cde}	93.02±1.68 ^{def}	90.96±0.81 ^e	90.15±0.75 ^{cd}
CVL	ND	ND	97.56±1.05 ^{abcd}	94.59±1.28 ^{cde}	97.09±0.38 ^b	

BVL: Bamboo Vinegar Liquor; WVL: Wood Vinegar Liquor; CVL: Chaff Vinegar Liquor

ND: not determined

Results are expressed as mean±SD (n=3).

Values within each column with the same superscript are not significantly different at $p < 0.05$.

anion과 반응하여 강력한 세포독성을 가진 peroxynitrite를 생성 시키기 때문에 탄화초액의 NO 생성 억제활성은 피부질환의 치료에 중요한 역할을 수행한다[Channon과 Guzik, 2002]. 따라서 피부 치료용 제품에 있어서 NO 생성 억제활성의 보완이 바람직하다고 본다(WVLI, WVLX). 본 연구를 통하여 평가한 시판 중인 19종의 시료 가운데 왕겨초액이 다양한 기능성을 가진 탄화초액으로 생각된다. 그러나 탄화초액의 성분조성은 탄화원료 및 탄화방법, 탄화온도 등에 따라 달라지기 때문에 기능성을 포함한 품질의 일관성을 유지하기 위해서 기능성을 대표하는 화학적 마커의 개발 등 관련 연구가 더욱 진행될 필요가 있다[Maga와 Chen, 1985; Alen 등, 1986; Guillen과 Ibargoitia, 1999].

초 록

목초액, 죽초액 및 왕겨초액을 포함한 시판 중인 19종의 탄화초액이 가지는 기능성을 DPPH 라디칼에 대한 전자공여활성과 Fe³⁺인 ferricyanide에 대한 환원력, linoleic acid의 자동산화 억제를 지질과산화 억제활성, LPS 자극에 의한 생쥐 대식세포주 RAW264.7세포의 NO생성에 대한 억제활성 및 탄화초액 처리에 의한 RAW264.7세포의 세포독성을 중심으로 평가하였다. 실험 결과, 탄화원료에 관계없이 정제도가 떨어지는 탄화초액의 경우, 전자공여활성, 환원력, 지질과산화 억제활성 및 NO 생성 억제활성을 포함한 항산화활성과 세포독성은 모두가 높게 나타났다. 반면, 피부이상 치료용이나 목욕용 정제 탄화액

의 경우, 세포독성은 낮지만 전반적인 항산화활성도 낮았고, 특히 염증 유발에 중요한 분자인 NO의 생성을 억제하는 활성도 낮게 나타났다. 19종의 탄화초액 중에서는 왕겨초액이 NO 생성 억제활성을 포함한 항산화활성이 높을 뿐 아니라 세포독성이 낮은 기능성이 뛰어난 탄화초액임이 관찰되었다.

Key words: antioxidation, carbonated vinegar liquor, cytotoxicity, functionality

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호 2009O1OFT113068122)에서 연구비를 지원받았으며, 지질과산화 실험을 기술적으로 지원해준 김주희 양과 왕겨초액을 공급해 준 (주)대원GSI의 이일규 실장에게 감사드립니다.

참고문헌

- Alen R, Kuoppala E, and Oesch P (1986) Formation of the main degradation compound groups from wood and its components during pyrolysis. *J Anal Appl Pyrolysis* **36**, 137-148.
- Channon KM and Guzik TJ (2002) Mechanism of superoxide production in human blood vessel: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors. *J Physiol Pharmacol* **53**, 515-524.
- Cho WK and Choi JH (2007) Effect of pyroigneous liquor on

- lipid metabolism in serum of CD rats. *Korean J Nutr* **40**, 24-30.
- Blois MS (1958) Antioxidant determination by use of a stable radical. *Nature* **26**, 1199-1200.
- Geon MG, Kim IS, Lee SC, Son, TG, Shim GY, and Kim, SN (2005) Effects of pyroligneous acid on control of Large Patch in Zoysiagrass. *Korean J Turfgrass Sci* **19**, 73-83.
- Ikeshima Y (1987) Manufacturing process and application of bamboo charcoal and bamboo vinegar, pp 121-158. Harnlim Journal Co., Seoul, Korea.
- Jeong CH and Shim KH (2002) Nitrite-scavenging and antioxidant activities of wood vinegar. *Korean J Food Preserv* **9**, 351-355.
- Kim HY and Kim YY (2007) Effect of the feeding probiotics on the performance and meat quality characteristics of the finishing pigs. *Korean J Food Sci Animal Resour* **27**, 73-79.
- Jeong JH, Jeong DE, Lee SJ, Seul KJ, Ryum CM, Park SH, and Ghim SY (2007) The effects of wood vinegar on growth and resistance of peppers. *Korean J Microbiol Biotechnol* **35**, 41-44.
- Kim GE, Park SB, and Ahn KM (1999) Charcoal and wood vinegar: Function and manufacturing process, pp 36-50. Harnlim Journal Co., Seoul, Korea.
- Kim SH, Choi DH, Lee SM, Nam JJ, Kim HM, Sohn SY, and Song BH (2003) Effect of wood vinegar on tomato seedling growth and nutrient uptake. *Korean J Org Agric* **11**, 103-113.
- Youn BS, Chang KM, Hwang SG, and Choi IS (2005) Effects of wood vinegar addition for meat quality improvement of old layer. *Korean J Poult Sci* **32**, 101-106.
- Kim YD, Bae ON, Chung SM, and Chung JH (2004) Improvement of haemostasis mediated by anti-platelet activities by plant vinegar. *J Toxicol Pub Health* **20**, 137-142.
- Kim YH, Kim SK, Kim KS, and Lee YH (2001) Composition of constituents of commercial wood vinegar liquor in Korea. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* **44**, 262-268.
- Maga JA and Chen Z (1985) Pyrazine composition of wood smoke as influenced by wood source and smoke generation variables. *Flavour Fragr J* **1**, 37-42.
- Guillen ND and Ibargoitia ML (1999) Relationship between the maximum temperature reached in the smoke generation processes from *Vitis vinifera* L. shoot sawdust and composition of the aqueous smoke flavoring preparations obtained. *J Agric Food Chem* **44**, 1302-1307.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay. *J Immunol Methods* **65**, 55-63.
- Murakami A, Gao G, Kim OK, Omura M, Yano M, Ito I, Furukawa H, Jiwajinda S, Koshimizu K, and Ohigashi H (1999) Identification of coumarins from the fruit of *Citrus hystrix* DC as inhibitor of nitric oxide generation in mouse macrophage RAW264.7 cells. *J Agric Food Chem* **47**, 333-339.
- Nathan C (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* **6**, 3051-3064.
- Oyaizu M (1986) Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr* **44**, 307-315.
- Park C, Choi YH, Lee WH, Choi BT, Lee YT, and Kim GC (2003) Up-regulation of Bax and down-regulation of Bcl-2 in Oak Smoke Flavoring (Holyessing)-induced apoptosis of human prostate carcinoma cells. *Korean J Oriental Physiol Pathol* **17**, 85-90.
- Siddhuraju P and Becker K (2007). The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. *Food Chem* **101**, 10-19.