

연구노트

Antioxidant and Antiatopic Effects of Refined Chaff Liquid Smoke

Hyeong-U Son¹, Jin-Chul Heo¹, Suk-Kyung Kim², Seon-Young Kwon²,
Gil-Hwan Han³, Sang-Han Lee^{1†}

¹Department of Food Science & Technology, Food & Bio-Industry Research Institute,
Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

²Daewon GSI Co., Ltd, Chilgok 718-802, Korea

³Oriental Industry Supporting Center, Daegu 706-828, Korea

정제 왕겨초액의 항산화 및 항아토피 활성

손형우¹ · 허진철¹ · 김숙경² · 권선영² · 한길환³ · 이상한^{1†}

¹경북대학교 식품공학과 및 식품생물산업연구소, ²대원 GSI, ³한방산업지원센터

Abstract

The refined chaff liquid smoke purified by the second or third filtering, supplemented with *Artemisia* extract or *Perillae folium* extract was investigated by measuring antioxidant and antiatopic activities. In DPPH and FRAP assays, three kinds of chaff liquid smokes had potential in antioxidant activity. Additionally, we assessed for antiatopic activity by using C57BL/6 mice with stimulation of dinitrofluorobenzene and observed that their ear swelling was alleviated by various fractions. Overall, all of the chaff liquid smoke reduced the response of swelling on ear epidermis. Especially, refined chaff liquid smoke supplemented with *Perillae folium* extract was most active than any other fractions.

Key words : chaff liquid smoke, *Perillae folium*, *Artemisia*, antioxidant, antiatopic

서 론

초액은 왕겨, 목재 등을 탄화시키는 과정에서 발생하는 연기를 냉각, 응축시킨 후 경질유와 타르를 제거한 수용액이다. 초액은 탄화시키는 원재료에 따라서 왕겨초액, 목초액, 죽초액 등으로 분류된다. 초액의 이용은 항균활성이 높은 것으로 알려져 있어 부패 방지 목적으로 식품첨가물로 이용하거나 토양살균, 주방기구 세척제, 향균제 등으로 이용되고 있다(1,2). 또한 초액 자체가 가지는 향(smoke flavor)은 식품에서 독특한 풍미를 부여하므로 식품첨가물 또는 가공류의 이취를 완화시켜주는 용도로도 이용되고 있다(3).

목초액의 성분은 80~90%의 물을 제외한 유기물에서 산류와 페놀류가 주성분이며, 원재료 종류에 따라 각각의 성분 함량은 차이가 나지만 주요한 산류는 acetic acid,

propionic acid, n-butyric acid 등이, 페놀류로는 syringol, guaiacol, 4-methylguaiacol, phenol, p-cresol, m-cresol 등이 확인되었다(4). 목초액 및 여러 초액의 효능은 아질산염 소거, 전자공여능 등의 실험을 통해 높은 항산화 및 항균 활성이 확인이 되었고(1,3), 그 밖에도 혈소판 응집억제 작용, 전립선암세포의 apoptosis 유발작용 등이 연구되어 있다(5,6).

본 연구는 초액의 정제정도에 따른 차이와 쑥과 자소엽을 추가하여 정제한 초액의 항산화 및 항아토피 활성을 확인하여 초액의 이용을 확대하는데 있다.

재료 및 방법

재 료

본 실험에 이용된 4종의 왕겨초액은 대원GSI (WaeGwan, Korea)에서 제공 받은 것으로 각각 2차 정제초액(2nd refined liquid smoke, 2 CV), 3차 정제초액(3rd refined liquid

†Corresponding author. E-mail : sang@knu.ac.kr
Phone : 82-53-950-7754, Fax : 82-53-950-6772

smoke, 3 CV), 쑥 정제초액(*Artemisia plus refined liquid smoke*, A CV), 자소엽 정제초액(*Perillae folium plus refined liquid smoke*, Pf CV)이다. 실험에 사용된 초액시료는 1M NaOH를 이용하여 pH 7.0으로 조절하였다.

DPPH 항산화 활성 검증

시료의 항산화 활성 측정은 DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 이용한 radical 소거활성능 측정방법을 이용하였다. 4종의 초액시료인 차 정제초액(2 CV), 3차 정제초액(3 CV), 쑥 정제초액(A CV), 자소엽 정제초액(Pf CV)에 0.2 mM DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 초액 추출물 4종과 DPPH solution을 1/20의 비율로 해서 실온에서 10분간 incubation한 후 517 nm (Victor3, Perkin Elmer)에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 처리 농도는 1, 3, 10 $\mu\text{L}/\text{well}$ (200 μl)로 처리하였다. DPPH radical 소거활성 비율(% inhibition)은 아래와 같이 계산하였다(7).

$$DPPH\ activity = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}}\right) \times 100$$

(A : Absorbance at OD 517 nm)

FRAP 항산화 활성 검증

FRAP (Ferric reducing antioxidant power) assay를 이용하여 radical을 어느 정도 환원시킬 수 있는지의 활성을 알아보았다. 실험을 위한 반응액으로는 acetate buffer (pH 3.6, 300 mM) : 10 mM의 TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) : 20 mM의 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 를 10 : 1 : 1의 비율로 섞어 실험 직전에 만들어 사용을 하였다. 시료의 처리 농도는 0.1~10 $\mu\text{L}/\text{well}$ (200 μl) 범위로 처리하였다. 반응액과 2차 정제초액(2 CV), 3차 정제초액(3 CV), 쑥 정제초액(A CV), 자소엽 정제초액(Pf CV)을 각각의 비율로 혼합한 후 10분간 상온에서 보관 후 590 nm에서 흡광도를 측정하였다(8).

마우스 동물모델을 이용한 항아토피 활성 검증

마우스 동물모델을 이용한 anti-allergic activity 실험은 다음과 같이 실시하였다. 알레르기의 대표적인 실험방법은 chemical을 이용한 알레르기성 피부염모델이므로 이를 적용하였다. 면역반응 유도물질은 DNFB (dinitrofluorobenzene)를 처리하여 마우스의 귀 부분에 염증반응을 유도한 다음, 2차 정제초액(2 CV), 3차 정제초액(3 CV), 쑥 정제초액(A CV), 자소엽 정제초액(Pf CV)을 처리하여 귀에서의 염증반응(inflammation)의 완화 정도를 확인하였다. 마우스는 썬타코(주)에서 5주령의 Balb/c 수컷을 구입하여 사육장 내에서 약 일주일간 순화과정을 거쳤다. 실험 0일째 0.5% DNFB 50 μl 를 복강에 감각한 후, 일주일 후 1일 간격으로 3회 0.2% DNFB를 마우스의 귀에 처리하여 알레르기를 유도하였다. 귀의 피부 표면에 염증반응이 일어난 것을 확인한

후 초액 4종 식염수(대조구)를 총 3회씩 5일간 20 μL 를 각각의 귀에 처리하였다. 마우스 귀를 절취한 다음 10% formalin을 이용하여 고정하였으며, 수세, 탈수, 파라핀 고정 등을 거쳐 약 6~7 μm 의 두께로 절편을 만들었다. Hematoxyline (H), eosin (E)을 이용하여 HE 염색과정을 거쳐 현미경을 이용하여 관찰하였다(9).

결과 및 고찰

DPPH 항산화 활성 검증

3차 정제초액(3 CV)은 DPPH 항산화 활성능이 다른 3종의 시료에 비해 가장 낮게 나타나는 것을 확인하였다(Fig. 1A). 시료의 농도에 따라 활성의 증가를 알 수 있었는데, 1~10 $\mu\text{L}/\text{well}$ 의 농도에 따라 약 2~18%의 활성을 나타냄을 확인하였다. 2차 정제초액(2 CV)은 시료의 농도 1~3 $\mu\text{L}/\text{well}$ 의 농도에 따른 활성은 1 $\mu\text{L}/\text{well}$ 처리한 경우 24%, 3 $\mu\text{L}/\text{well}$ 을 처리한 경우 71%, 10 $\mu\text{L}/\text{well}$ 을 처리한 경우 82%의 높은 활성을 나타내었다. 쑥 정제초액은 2차 정제초액과 마찬가지로 농도에 따라 활성을 증가함을 나타내었으며, 1 $\mu\text{L}/\text{well}$ 일 경우 27%, 3 $\mu\text{L}/\text{well}$ 에서는 61%, 10 $\mu\text{L}/\text{well}$ 에서는 82%의 활성을 나타내었다. 자소엽 정제초액은 1 $\mu\text{L}/\text{well}$ 일 경우 20%, 3 $\mu\text{L}/\text{well}$ 에서는 64%, 10 $\mu\text{L}/\text{well}$ 에서는 79%의 활성을 나타내었다.

초액 4종(2차 정제초액, 3차 정제초액, 쑥 정제초액, 자소엽 정제초액)의 DPPH 활성 실험 결과 2차 정제초액(2 CV) 쑥 정제초액(A CV), 자소엽 정제초액(Pf CV) 3종에서 높은 항산화 활성이 있음을 확인할 수 있었으며, 3차 정제초액(3 CV)에서는 상대적으로 활성이 낮게 나타나는 것을 확인하였다. 이는 2차 정제초액이 높은 항산화 활성을 보이는 것에 비해 정제과정을 거친 3차 정제초액은 활성이 감소되는 것으로 사료된다.

Jeong 등(1)은 대두유에 목초액을 첨가하였을 때 DPPH 실험의 항산화 활성을 확인하였으며, 목초액을 첨가하지 않은 대조구보다 목초액을 처리한 군에서 저장 기간 동안 TBA (2-thiobarbituric acid) 수치가 더 낮게 확인되어 지방의 산패 억제 효과를 나타내었다. Kim 등(2)은 왕겨초액, 목초액, 죽초액을 포함한 19종의 탄화초액 중 대부분 모두 높은 DPPH 및 지질과산화에 대한 억제활성을 확인하였다. 특히 정제되지 않은 원액이 정제 탄화초액보다 높은 활성을 보인 것은 본 연구의 결과와 마찬가지로 정제 과정 중에 항산화 활성을 지니는 성분들이 손실됨을 알 수 있었다.

FRAP 항산화 활성 검증

3차 정제초액(3 CV)은 DPPH 실험에서의 결과와 마찬가지로 상대적으로 다른 시료에 비해 활성이 낮게 나오는 것을 확인하였다(Fig. 1B). 정제초액(2 CV), 쑥 정제초액(A CV), 자소엽 정제초액(Pf CV)이 3차 정제초액(3 CV)에 비

해 상대적으로 활성이 매우 높게 나타남을 확인하였다. 3종의 초액 모두 DPPH와 마찬가지로 비슷한 활성을 나타냄을 확인하였다. Kim (2)등은 환원력 실험을 통해 죽초액과 목초액 시료의 대부분이 0.008% (v/v)의 낮은 농도에서도 높은 항산화 활성을 확인하였으며, 본 실험결과에 덧붙여 초액이 전반적으로 환원력에 의한 항산화 활성을 나타냄을 확인하였다.

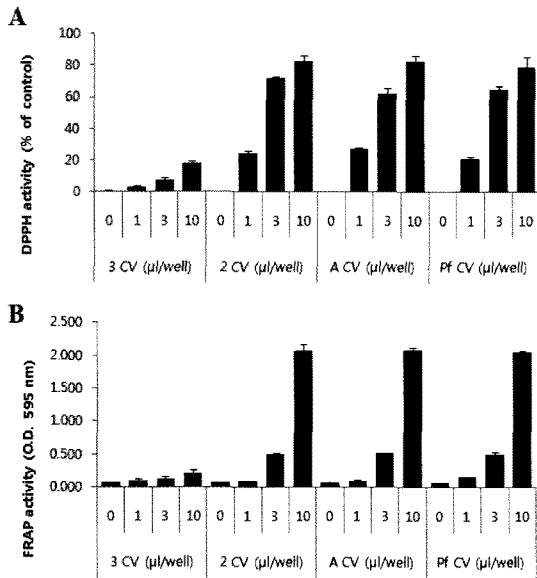


Fig. 1. Antioxidant activity by DPPH scavenging activity (A) or total antioxidant power by FRAP assay (B).

2 CV: Samples which are 2nd refined chaff liquid smoke; 3 CV: 3rd refined chaff liquid smoke; A CV: *Artemisia* plus refined chaff liquid smoke; and Pf CV: *Perillae folium* plus refined chaff liquid smoke are shown.

동물모델을 이용한 항아토피 활성 검증

DNFB를 이용하여 C57BL/6 마우스의 귀에 염증을 유도한 다음 초액을 처리하여 염증이 억제되는 정도를 관찰하였다. 염증을 유도한 군에서는 귀에 부종과 함께 윤기, 형태 등에 손상이 나타남을 알 수 있었으며, 이에 반해 2차 정제초액(2 CV), 3차 정제초액(3 CV), 썩 정제초액(A CV), 자소엽 정제초액(Pf CV)을 처리한 군에서는 손상 정도가 육안으로 보기에 크게 감소한 것을 확인하였다(Fig. 2A). 육안으로 확인한 손상 정도는 2차 정제초액과 3차 정제왕겨초액을 처리한 군에 비해 썩 초액과 자소엽 초액에서 처리한 시료군에서 다소 손상 정도가 적게 나타남을 확인하였다.

실험에 사용된 귀 조직을 파라핀블럭을 만들어 슬라이드를 제작하여 HE (hematoxyline-eosin) 염색을 이용하여 현미경으로 관찰하였다. DNFB를 이용하여 염증을 유도한 군은 무처리군에 비해 귀의 두께가 현저히 증가한 것을 알 수 있었으며, 특히 귀상피의 두께가 크게 증가한 것을 알 수 있었다(Fig. 2B, C). 반면 초액 4종을 처리한 군에서는 현미경 관찰 결과 귀의 두께와 상피의 두께가 현저히 감소된 것을 확인하였다. DNFB를 처리하여 염증을 유도한 군에서

는 귀의 두께 증가와 함께 면역세포의 침투가 일어난다. 반면 초액을 처리한 경우 면역세포의 침투가 현저히 감소한 것을 확인하였다.

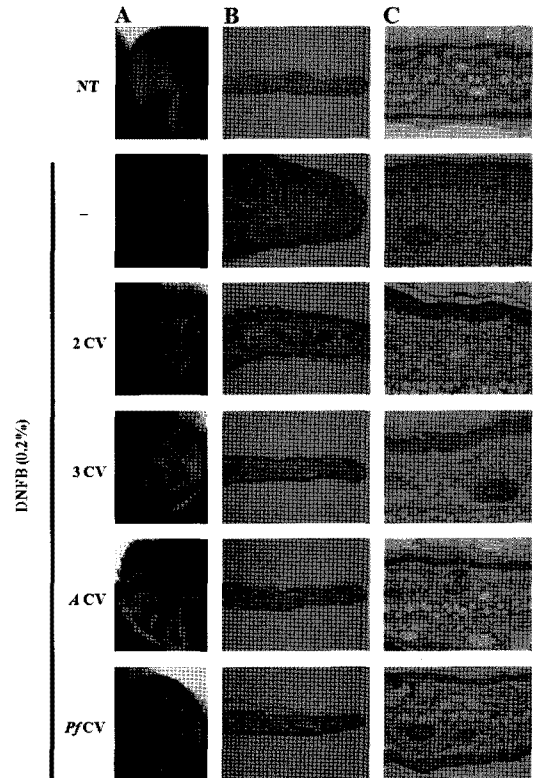


Fig. 2. Antiatopic effect of refined chaff liquid smokes by an animal DNFB model. (A) C57BL/6 mice develop a chronic skin inflammation and the healing activity.

(B and C) Histology of the atopy animal models. Hematoxylin and eosin-stained ear sections (x 100) and (x 400). 2 CV: Samples which are 2nd refined chaff liquid smoke; 3 CV: 3rd refined chaff liquid smoke; A CV: *Artemisia* plus refined chaff liquid smoke; and Pf CV: *Perillae folium* plus refined chaff liquid smoke are shown.

아토피 동물모델에서 귀의 두께를 측정된 결과 염증을 유도한 경우 귀의 두께가 약 514% 증가함을 알 수 있었으며, 초액 4종을 처리한 결과 모든 시료에서 귀의 두께를 감소시키는 것으로 나타났다(Fig. 3). 정제초액을 처리한 결과 약 158%, 썩 초액을 처리한 경우 약 196%, 자소엽 초액을 처리한 경우 약 115%, 3차 정제초액을 처리한 경우 약 246% 증가하는데 그쳤다. 귀의 두께 증가 측정 결과 자소엽 초액이 귀의 두께 증가를 크게 감소시키는 것으로 나타났으며, 2차 정제초액, 썩 초액, 3차 정제초액의 순으로 나타났다.

귀상피의 경우 두께와 마찬가지로 DNFB를 처리한 경우 두꺼워지는 양상을 보이는데, 아토피를 유도한 경우 약 785% 증가하는 것을 확인하였다. 반면 초액류를 처리한 경우 크게 감소하는 것을 확인하였다. 2차 정제초액을 처리한 결과 약 234%, 썩 초액을 처리한 경우 약 312%, 자소엽 초액을 처리한 경우 약 204%, 3차 정제초액을 처리한 경우 약 239%로 증가 정도가 크게 감소함을 알 수 있었다. 귀의

두께 증가와 마찬가지로 자소엽 초액을 처리한 군에서 증가 정도가 가장 적게 나타남을 확인하였다.

초액 정제 이후에 생성되는 물질들이 피부질환 및 항암에 효과를 가지는 성분들이라 사료된다.

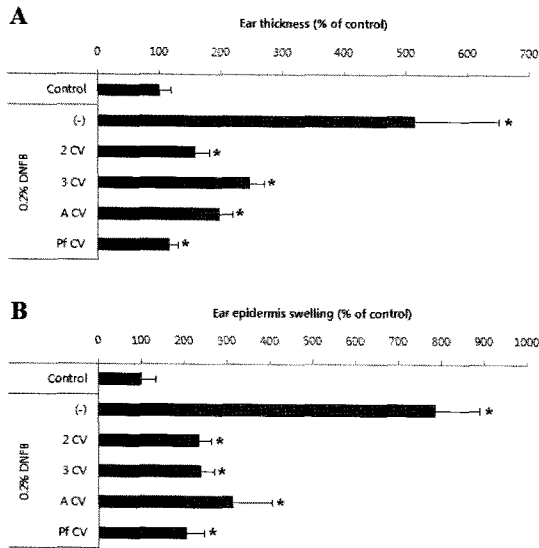


Fig. 3. Comparison of alleviation of skin inflammation by measuring ear thickness and swelling. (A) Ear thickness levels and (B) ear epidermis swelling levels.

2 CV: Samples which are 2nd refined chaff liquid smoke; 3 CV: 3rd refined chaff liquid smoke; A CV: *Artemisia* plus refined chaff liquid smoke; and Pf CV: *Perillae folium* plus refined chaff liquid smoke are shown.

염증반응에 관여된 효소인 COX-2 (cyclooxygenase-2), iNOS (inducible nitric oxide synthase)는 RAW264.7에서 LPS (lipopolysaccharide)의 유도에 의해 활성화되어 일산화질소를 생성하므로, 이와 같은 대식세포 및 면역세포에서 일산화질소의 합성 저해를 통한 항염증 소재들의 확인이 가능하다(10). 참나무 목초액은 RAW264.7 세포에 독성이 없는 농도에서 일산화질소의 활성을 86%까지 감소시킨다고 보고하였다(11). Kim 등(2)은 19종의 초액 중 정제도가 높은 탄화초액이 RAW264.7세포에서 염증 유발에 주요 분자인 일산화질소 억제 활성을 억제하는 것을 보고하였다. 반면에 높은 활성을 가지는 초액이 세포 독성이 높게 나타나므로 그에 대한 연구가 필요하다(2).

목초액에는 탄화전 상태에 비해 목재에는 존재하지 않는 새로운 성분을 가진다. 그 중 페놀성 성분들로는 4-ethyl-2-methoxyphenol, 2,6-dimethoxyphenol 등이 있다(12). 목초액은 민간요법으로 습진 등에도 이용이 되어 왔는데 이러한 페놀성 성분들 중 4-ethyl-2-methoxyphenol이 가장 높은 피부사상균을 억제하는 효과를 가졌다(12). Rat에서 morpholine 및 nitrite에 의한 강력한 발암물질인 N-nitrosomorpholine 형성실험에서는 목초액에 존재하는 성분 중의 하나인 2,6-dimethoxyphenol(syringol)를 처리하였을 때 rat의 위와 혈액에서 N-nitrosomorpholine의 양이 약 89%까지 감소한 것을 확인하였다(13). 이러한 결과들을 미루어 보았을 때

요 약

본 연구에서는 초액 4종인 2차 정제초액(2nd refined liquid smoke, 2 CV), 3차 정제초액(3rd refined chaff liquid smoke, 3 CV), 3차 정제초액(*Artemisia* plus refined chaff liquid smoke, A CV), 자소엽 정제초액(*Perillae folium* plus refined chaff liquid smoke, Pf CV)의 항산화 능력과 항아토피 효과를 연구하였다. 항산화능 측정결과로 DPPH 활성은 3차 정제초액을 제외한 3종에서 높은 항산화 활성을 확인할 수 있었고, FRAP 실험 역시 DPPH와 마찬가지로 3종의 초액에서 높은 활성을 보였다. DNFB를 이용한 C57BL/6 마우스의 귀에 염증 유발을 통한 실험에서는 4가지 초액 모두 높은 활성을 보였다. 특히 육안, 귀의 두께 및 귀의 상피 두께를 확인한 결과 자소엽 초액이 염증을 유도한 군에 비해 두께가 현저히 감소하여 가장 높은 활성을 보였다.

References

- Jeong CH, Shim KH (2002) Nitrite-scavenging and antioxidant activities of wood vinegar. *Korean J Food Preserv*, 9, 351-355
- Kim SP, Nam SH (2009) Evaluation and comparison of antioxidant activities of nineteen commercial carbonated vinegar liquors. *J. Appl Biol Chem*, 52, 174-179
- Lee FZ, Lee BD, Eun JB (2006) Antimicrobial activity and oxidative stability of bamboo smoke distillate on soybean oil during storage. *Korean J Food Sci Tech*, 38, 816-822
- Kim YH, Kim SK, Kim KS, Lee YH (2001) Composition of constituents of commercial wood vinegar liquor in Korea. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol*, 44, 262-268
- Kim YD, Bae ON, Chung SM, Chung JH (2004) Improvement of Haemostasis mediated by anti-platelet activities by plant vinegar. *J Toxicol Public Health*, 20, 137-142
- Park C, Choi YH, Lee WH, Choi BT, Lee YT, 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 Physiology & Pathology*, 17, 85-90
- Ryu HY, Heo JC, Hwang JS, Kang SW, Yun CY, Lee SH, Sohn HY (2008) Screening of thrombin inhibitor

- and its DPPH radical scavenging activity from wild insects. *J Life Sci*, 18, 363-368
8. Heo JC, Nam SH, Kang SW, Hong IP, Lee KK, Park JY, Kim KH, Han SY, Lee SH (2007) Comparison of antioxidant, anticancer and immunomodulating activities of extracts from DongChongXiaCao. *Korean J Food Preserv*, 14, 681-687
 9. Yanagisawa R, Takano H, Inoue K, Koike E, Sadakane K, Ichinose T (2008) Effects of maternal exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate during fetal and/or neonatal periods on atopic dermatitis in male offspring. *Environ Health Perspect*, 116, 1136-1141
 10. Rainsford KD (2005) The coxib controversies. *Inflammopharmacology*, 13, 331 - 341
 11. Jung IS, Kim YJ, Gal SW, Choi YJ (2007) Antimicrobial and antioxidant activities and inhibition of nitric oxide synthesis of oak wood vinegar. *J Life Sci*, 17, 105-109
 12. Ikegami F, Sekine T, Fujii Y (1998) Anti-dermatophyte activity of phenolic compounds in "mokusaku-eki". *Yakugaku Zasshi*, 118, 27-30
 13. Virk MS, Issenberg P (1986) Effects of phenol and 2,6-dimethoxyphenol (syringol) on in vivo formation of N-nitrosomorpholine in rats. *Carcinogenesis*, 7, 867-870

(접수 2010년 10월 14일 수정 2011년 2월 9일, 채택 2011년 2월 18일)