

생물전환에 의한 발효 목초액의 항산화 활성

조영호¹, 조재수¹, 이계원^{1*}
¹건양대학교 제약공학과

Antioxidant activity of wood vinegar by bioconversion

Young Ho Cho¹, Jae Soo Cho¹ and Gye Won Lee^{1*}

¹Department of Pharmaceutical Engineering, Konyang University

요약 활성 산소종은 반응성이 매우 크고 지질, 단백질 및 핵산에 산화를 유발하여 잠재적으로 세포에 매우 해로운 물질이다. 활성 산소종은 또한 인체에 있어서 노화, 발암, 죽상경화증 유발과 같은 해로운 영향을 준다고 알려져 있다. 본 연구에서는 총산도, 초산, pH 및 총 폴리페놀과 총 플라보노이드의 함량 등을 분석하였고, 생물전환된 목초액의 항산화 활성을 조사하기 위하여 DPPH, 초과산화물 음이온, 과산화수소, 산화질소 라디칼 소거 활성을 측정하였다. 생물전환된 목초액의 총산도와 초산의 양은 생물전환 전보다 낮았지만, pH는 오히려 높게 나타났다. 생물전환된 목초액의 총 폴리페놀과 총 플라보노이드의 함량은 각각 11.17 mg/ml 과 0.42 mg/ml였다. 생물전환된 목초액의 각종 라디칼을 50% 소거하는 농도는 초과산화물 라디칼 소거활성 < DPPH 라디칼 소거활성 < 과산화수소 라디칼 소거활성 < 산화질소 라디칼 소거활성 순으로 나타났다. 따라서 목초액을 생물전환할 경우 여러 가지 라디칼에 대한 소거활성을 높여 천연 의약품 및 화장품 소재로 개발 가능성이 있음을 알 수 있다.

Abstract Reactive oxygen species (ROS) are reactive and potentially harmful to cells, causing oxidation of lipids, proteins, and DNA. In humans, the deleterious effects of ROS have been linked with aging, carcinogenesis, and atherosclerosis. In order to investigate an antioxidant activity of wood vinegar by bioconversion, we preferentially analyzed the total acidity, acetic acid, pH, and contents of total polyphenols and flavonoids, respectively. Also, we evaluated the scavenging abilities on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radicals, superoxide anion radicals, hydrogen peroxide radicals, and nitric oxide radicals. The total acidity and amount of acetic acid of wood vinegar after bioconversion were lower than those of wood vinegar before bioconversion, but the pH was higher than that of wood vinegar before bioconversion. The contents of total polyphenols and flavonoids of wood vinegar after bioconversion were 11.17 mg/ml and 0.42 mg/ml, respectively. The SC₅₀ values were in order of superoxide anion radical scavenging activity < DPPH radical scavenging activity < hydrogen peroxide radical scavenging activity < nitric oxide radical scavenging activity. Therefore, these results suggest that wood vinegar by bioconversion can be useful as primary antioxidants for medicines and cosmetics.

Key Words : Wood vinegar, Bioconversion, Antioxidant, Radical scavenging activity, Reactive oxygen species

1. 서론

목초액은 참나무류 (*Quercus sp.*), 소나무 (*Pinus densiflora*) 등의 천연물질을 500~700℃로 탄화시킬 때 발생하는 연기와 수증기를 포집하여 냉각·응축시켜 30 일에서 1년 이상 상온에서 숙성·정제시켜 정제하여 얻을 수 있는 담갈색의 액상 천연물질로서, 항균, 보존성 향상, 가공식품의 향취 개선 등의 목적으로 식품 첨가제, 농업용으로 토양살균 및 축산분뇨의 탈취, 작물의 해충기피, 퇴비 발효촉진, 식물생장 및 뿌리생육 촉진의 목적으로 이용되고 있다[1].

목초액은 채취할 때 연기의 종류에 따라 그 성분과 성

*교신저자 : 이계원(pckmon@konyang.ac.kr)

접수일 11년 08월 23일

수정일 11년 09월 06일

게재확정일 11년 10월 06일

상에 커다란 차이가 있다. 보통 물이 80~90%를 차지하고 나머지가 유기물인데 유기물 중에서는 산류, 페놀류가 주 성분을 이루고 카르보닐 화합물, 중성 및 염기성 등 200여 종류 이상의 성분을 함유하고 있다[2,3]. 그 중 중요한 성분인 유기산은 50% 이상을 함유하고 있는 것으로 알려져 있으며, 특히, 초산은 3.0% 정도 함유되어 있다고 알려져 있다[4-7].

또한, 목초액에는 다량의 유기산과 침투하기 쉬운 성분을 함유하고 있어 피부 표면에 기생하는 세균, 곰팡이에 대한 살균작용이 뛰어나다 [8]. 피부 표면의 각질 연화나 수렴작용, 여드름, 노인성 건성 피부염, 만성 습진과 움 등의 피부질환에 효과가 탁월한 것으로 밝혀졌다 [9]. 무좀의 경우에도 무좀을 일으키는 백선균이 목초액의 pH(산도) 조건에서는 생식할 수 없으므로 무좀 또한 쉽게 퇴치할 수 있어 이것을 화장품에 이용할 경우 큰 효과가 기대되는 것으로 알려져 있다[10].

이러한 장점이 있는 목초액에는 타르, 페놀, 메탄올, 크레졸, 벤조피렌 등과 같은 유해 성분이 함유되어 있고, 목초액 고유의 탄내취와 기호성에 맞지 않기 때문에 그 적용이 제한되어 있다 [11,12]. 따라서 목초액을 직접 바르거나 식품, 음료 및 화장품 등에 첨가제로 사용하기에 적합하도록 하기 위해서는 조목초액의 정제 및 탈취가 요구된다.

생물전환 (biotransformation)이란 생물공정 (bioprocessing), 생물전환 (bioconversion), 생합성 (biosynthesis) 그리고 생촉매 (biocatalysis) 등의 용어와 의미상 중복성을 지니는 용어로, 미생물을 이용하여 전구물질로부터 원하는 산물을 제조하는 기술을 말한다. 생물전환 공정은 기존의 발효공정과 비교해 볼 때 발효공정이 상대적으로 간단한 원료물질에서 출발하는 반면, 생물전환 공정은 미생물 또는 효소의 기질에 대한 선택성을 이용하여 전구물질로부터 산물을 생산한다는 점에서 차이를 보이고 있다. 이와 같은 점에서 생물전환 공정은 발효기술을 고도화시킨 에너지 절약형의 첨단기술 분야로 특히, 의약품이나 화장품의 개발에 있어서 생물전환 공정은 여러 가지 방법으로 이용되어 의약품, 화장품의 유용성 및 효과성을 향상시키는 데 기여할 수 있는 것으로 알려져 있다.

EM은 effective microorganisms의 머리글자를 딴 약자로서 유용한 미생물 즉, 효모, 유산균, 누룩균, 광합성 세균, 방선균 등 84여 종의 미생물을 함유하여 약취 제거, 수질 정화, 금속과 식품의 산화방지, 남은 음식물 발효 등에 탁월한 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

목초액의 성분별 유용성은 별로 알려지지 않다가 Lee 등의 연구에 의해 분획별 항균 활성 및 항산화 활성을 측정하여 유용성을 밝힌 바 있으나 [1] 기존의 목초액에서

는 여러 가지 문제를 가지고 있어 실제적으로 사용에 큰 제한을 받고 있다.

따라서 본 연구에서는 정제된 목초액을 제조하여 이엠 효소액으로 생물전환시킨 후에 각종 성분의 함량 변화 및 DPPH radical, superoxide anion radical, hydrogen peroxide radical, nitric oxide radical 소거활성 등의 항산화 활성 변화를 측정함으로써 천연 항산화제의 개발 가능성을 알아보고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 기기 및 시약

시약으로는 목초액은 강원 참숯과 경북 크리퍼로부터 조목초액을 구입하여 제조하였으며, 이엠 효소액과 당밀은 주식회사 이엠 (Korea) 에서 구입하여 사용하였다. 표준품으로 초산 (Sigma, U.S.A.)을, 분석용 시약으로 HPLC용 메탄올, 아세토니트릴은 J. T Baker사에서 각각 구입하여 사용하였다. 또한, 항산화 활성을 측정하기 위해 naphthylamine, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), nitro blue tetrazolium, EDTA, xanthine sodium salt (minimum 99%), xanthine oxidase, peroxidase 및 quercetin은 Sigma, alumnun nitrate dihydrate, nitrite는 Junsei (Japan), PBS는 Biowhittaker (U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다. 기타 시약은 특급 또는 일급을 구입하여 사용하였다.

기기로는 HPLC (Alliance 2690, Waters Millenium System, U.S.A), 원심분리기 (HM-150IV, Hani, Korea), UV/Vis spectrophotometer (Helios β, U.S.A.), Microplate Reader (Sunrise Basic, Tecan, Austria), 항온수조 (SAW-201, Shinseng Ins. Korea) 및 pH meter (720P, Istek, Korea)를 사용하였다.

2.2 목초액의 제조 및 생물전환

기존 목초액의 문제점을 개선하기 위하여 Byun 등 [13]의 방법에 따라 정제되어진 목초액을 제조하였다. 즉, 참나무목 참나무과 참나무속의 참나무 (*Quercus acutissima*)의 껍질 및 목질부를 전통 숯가마에 넣고 내부 온도를 350~435℃로 가열하여 탄화시키면서 발생하는 연기를 지상부에 노출된 굴뚝 밑에서 10~20 cm 부분으로부터 배열온도 80~150℃사이에서 냉각 응축되는 조목초액을 얻었다. 얻어진 조목초액과 과산화수소를 촉매인 인산 존재 하에서 80℃로 약 12~14시간 동안 산화반응시켜 생성되는 유기 현탁물의 응집물을 제거하였다. 여기에

건조 썬과 녹차, 활성탄 및 숯을 넣고 36℃에서 25~30일간 숙성시킨 다음 90~120℃에서 증류하여 이합체 유기산을 정제하여 초산나트륨 또는 황산아연으로 pH 3~3.5가 되도록 혼합 조정된 다음 미세 이물질이 제거되도록 여과하여 정제된 목초액을 얻었다.

또한, 정제된 목초액 25 g에 당밀 25 g, 이엠 효소액 25 g을 각각 첨가하여 잘 밀봉한 후 상온에서 일주일간 생물전환시켜 여과한 발효 목초액을 제조하여 검체로 사용하였다.

2.3 성분 확인 및 정량

목초액의 성분에는 초산을 비롯하여 유기산이 많이 들어 있으나 지표성분으로 유기산 중 가장 많이 함유되어 있는 초산 성분을 분석하여 다른 물질의 첨가에 의해 변화된 양을 확인하여 측정하였다.

또한, 각 검체에 함유되어 있는 총 폴리페놀과 플라보노이드의 함량을 측정하여 함량 변화를 측정하여 생리활성 시험 결과와 이들 양과의 상관성을 검토하고자 하였다.

2.3.1 총산도 및 pH

목초액에는 여러 가지 유기산이 들어 있으므로 이를 초산의 양으로 환산하여 전체적인 총산의 양을 측정하였다. 목초액을 취하여 10배 희석하고 지시약으로 페놀프탈레인을 넣고 0.1N 수산화나트륨 표준액을 뷰렛에 넣고 종말점까지 적정하여 소비된 0.1N 수산화나트륨의 소비량을 측정하여 들어있는 총산의 양을 아래의 식과 같이 계산하여 측정하였다.

$$\text{총산도}(\%) = \frac{e \times V \times f}{S} \times 10 \times 100$$

e : 1 ml 반응중량 (0.1N NaOH 액 1 ml = 0.006 g CH₃COOH)

v : 0.1N NaOH의 소비량 (ml)

f : 0.1N NaOH의 Factor (=1)

s : 검체량 (g)

또한, 검체의 pH는 약전 일반시험법 pH 측정법에 따라 시험하여 측정하였다.

2.3.2 초산

초산의 함량분석은 Lee 등에 의해 개발된 분석법에 따라 실시하였다[14]. 즉, 목초액 20 ml에 물을 가해 100 ml로 맞추어 검액으로 하고, 초산 표준품 0.1 g을 취해 물을

넣어 100 ml로 하여 표준 원액으로 한 후, 표준 원액을 물로 희석하여 표준액으로 하였다.

표준액 및 검액에 대하여 아래의 기기 조건에 따라 시험한 후 각각의 피크 면적비를 구하여 정량하였다.

[HPLC 조건]

- 컬럼 : Atlantis™ dC₁₈ (4.6×250 mm, 5 μm, Waters)
- 컬럼 온도 : 25℃
- 검출기 : 가시부 흡광광도계 (230 nm)
- 이동상 : 아세토니트릴 : 0.1% 인산 (5:95, v/v%)
- 유속 : 1.0 ml/min
- 시료주입량 : 20 μl

2.3.3 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드

총 폴리페놀 화합물은 Folin-Denis 방법[15]으로 측정하였으며, 적당하게 희석된 시료 1 ml에 95% ethanol 1 ml와 증류수 5 ml를 첨가하고 1N Folin-Ciocalteu's reagent 0.5 ml를 넣어 잘 섞어 주었다. 5분간 방치한 후, 10% Na₂CO₃ 1 ml를 가한 후, 725 nm에서 1시간 이내에 흡광도를 측정하여 탄닌산을 이용하여 미리 작성된 검량선으로 부터 양을 환산하였다. 이 때 검량선은 탄닌산 표준품 10 mg을 에탄올 5 ml에 용해시켜 표준 원액을 제조한 다음 적당히 희석하여 작성하였다.

총 플라보노이드 함량은 Moreno 등 [16]의 방법에 의해 측정하였다. 각 검체 100 μl를 취하여 10% 질산 알루미늄 (aluminum nitrate) 와 1 μM 초산 칼륨 (potassium acetate)을 함유하는 80% 에탄올 4.3 ml에 혼합하여 실온에서 40분 정치한 뒤 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 총 플라보노이드 함량은 quercetin을 이용하여 작성한 표준 곡선으로부터 환산하여 함량을 구하였다.

2.4 항산화 활성

2.4.1 DPPH radical 소거활성

DPPH radical에 대한 소거활성은 Blois 등 [17]의 방법을 변형하여 측정하였다. 각 시료 20 μl에 0.1 mM DPPH 180 μl를 넣고 vortex한 후, 30분 동안 방치한 다음 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거능은 다음 식으로 나타내었다.

$$\text{DPPH radical 소거능}(\%) = (\text{대조구의 흡광도} - \text{반응구의 흡광도}) / \text{대조구의 흡광도} \times 100$$

2.4.2 Superoxide anion radical 소거활성

Superoxide anion radical 소거활성은 Okamura 등[18]

의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, 시료 20 μl , 2 mM xanthine과 0.1 mM NBT 혼합액 160 μl 를 넣고, 0.05 mM EDTA가 포함된 50 mM potassium phosphate buffer (pH7.4)에 녹인 xanthine oxidase (0.5 unit/ml) 20 μl 를 가하여 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 여기에 2.5N HCl 80 μl 를 첨가하여 반응을 중지시키고 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. Superoxide anion radical 소거능은 다음 식으로 나타내었다.

$$\text{Superoxide anion 소거능 (\%)} = (\text{대조구의 흡광도} - \text{반응구의 흡광도}) / \text{대조구의 흡광도} \times 100$$

2.4.3 Hydrogen peroxide radical 소거활성

Hydrogen peroxide radical 소거활성은 Park 등 [19]의 방법에 따라 96-well microplate에 phosphate buffered saline (PBS) 100 μl , 시료 20 μl 를 넣고 1 mM H₂O₂를 가하여 5분 방치한 다음, 1.25 mM ABTS 30 μl 와 PBS에 녹인 peroxidase (1 unit/ml) 30 μl 를 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Hydrogen peroxide radical 소거능은 다음 식으로 나타내었다.

$$\text{Hydrogen peroxide 소거능 (\%)} = (\text{대조구의 흡광도} - \text{반응구의 흡광도}) / \text{대조구의 흡광도} \times 100$$

2.4.4 Nitric oxide (NO) radical 소거활성

Nitric oxide radical 소거작용은 Kato 등 [20]의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 즉, 1 mM의 NaNO₂ 용액 20 μl 에 시료 40 μl 를 첨가하고 여기에 0.1N HCl (pH 1.2) 용액 140 μl 를 가하여 전체를 200 μl 로 하였다. 그리고 37°C에서 1시간 동안 반응시켜 얻은 반응액을 40 μl 씩 취하고 여기에 2% 초산 용액 200 μl 를 첨가한 다음 Griess 시약 (30% acetic acid로 조제한 1% sulfanilic acid와 1% naphthylamine을 1:1 비율로 혼합한 것) 16 μl 를 가하여 혼합시켜 빛을 차단한 상태로 실온에서 15분간 방치시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하여 nitric oxide radical의 소거활성을 평가하였다. 공시험은 Griess 시약 대신 증류수를 가하여 같은 방법으로 행하였다. Nitric oxide radical 소거능은 다음 식으로 나타내었다.

$$\text{NO radical 소거능 (\%)} = [(C-D) - (A-B)] / (C-D) \times 100$$

A : 시료의 흡광도

B : 시료 공시험구의 흡광도

C : 대조구의 흡광도

D : 대조구 공시험구의 흡광도

2.5 자료분석 및 통계처리

모든 실험결과는 평균±표준편차로 표기하였으며, 각 반응구를 대조구에 대한 백분율로 나타내었다. 각 군간의 통계적 유의성 검증은 Student's *t*-test로 하였으며, *p* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 총산도, 초산 및 pH

본 실험의 제조방법에 따라 제조된 목초액과 이엠에 의해 생물전환된 목초액의 성분 변화 및 효능 변화를 평가하기 위하여 총산도, 초산 및 pH를 측정하여 표 1에 나타내었다. 그 결과 총산도 및 초산의 함량은 생물전환된 목초액에서 감소하는 것으로 나타났으며, pH는 약간 증가해서 3.78±0.01의 값을 나타내었다. 이 값의 차이는 목초액을 생물전환하기 위해 이엠과 당밀을 동량으로 혼합한 상태에서 처리하므로 실제적으로는 차이가 없는 것으로 사료된다.

[표 1] 생물전환 전, 후 목초액의 총산도, 초산 및 pH 변화
[Table 1] Changes of total acidity, acetic acid, and pH in wood vinegar by non-bioconversion / bioconversion

Bioconversion	Total acidity (%)	Acetic acid (%)	pH
Before	5.29±0.04	2.12±0.06	2.28±0.01
After	3.16±0.17	1.02±0.03	3.78±0.01

Each value represents mean of three determinations ± the standard deviations.

3.2 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드

페놀성 화합물은 식물체에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 다양한 구조와 분자량을 가진다. 이들은 phenolic hydroxyl 작용기를 가지기 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 쉽게 결합하여 항암, 항고혈압, 항염증 및 항산화 등의 다양한 생리활성 기능을 가지는 것으로 알려져 있다[21]. 생물전환 전, 후 목초액 중의 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과를 표 2에 나타내었다. 표 2의 결과에서 볼 수 있듯이 총 폴리페놀 함량 변화는 생물전환 전의 목초액에서는 0.05±0.01 mg/ml, 생물전환 후의 목초액에서는 11.17±0.02 mg/ml로 나타나 생물전환 전의 목초액과 비교했을 때 폴리페놀 함량이 200배 이상 증가되어 항산화 활성에 있어서 큰 변

화가 기대되었다.

또한, 총 플라보노이드는 함량을 측정한 경우에도 폴리페놀의 변화 경향과 유사하였다. 즉, 생물전환 전의 목초액과 비교했을 때 생물전환 후의 목초액에서 플라보노이드 함량이 약 2.3배 정도 증가된 것으로 나타났다.

[표 2] 생물전환 전, 후 목초액의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 변화

[Table 2] Changes of the content of total polyphenol and flavonoid in wood vinegar by non-bioconversion / bioconversion

Bioconversion	Total polyphenol (mg/ml)*	Total flavonoid (mg/ml)**
Before	5.29±0.04	2.12±0.06
After	3.16±0.17	1.02±0.03

Each value represents mean of three determinations ± the standard deviations.

* Milligrams of total polyphenol content / ml of samples based tannic acid as standard.

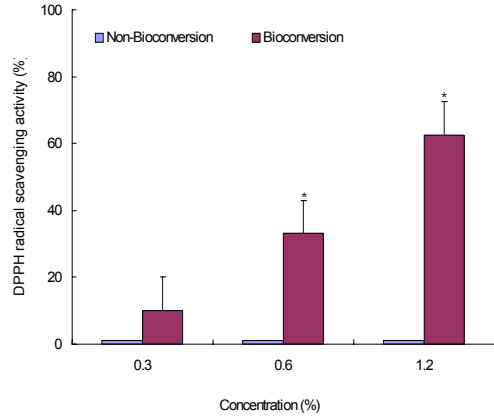
** Milligrams of total flavonoid content / ml of samples based quercetin as standard.

3.3 항산화 활성

3.3.1 DPPH radical 소거활성

DPPH radical은 짙은 자색을 띠는 비교적 안정한 자유 라디칼로서 cystein, glutathion과 같은 황아미노산과 L-ascorbic acid 및 BHA 등에 의해 환원되어 탈색되므로 다양한 천연 소재로부터 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다. 자유 라디칼은 인체 내에서 지질 또는 단백질 등과 결합하여 노화를 일으키기 쉬운데 폐놀성 화합물의 경우 자유 라디칼을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 강해 인체 내에서 자유 라디칼에 의한 노화를 억제하는 척도로 이용할 수 있다 [22]. 또한, An 등은 [23] 한약재의 항산화 활성을 검증한 실험에서 높은 DPPH radical 소거 활성을 보이는 한약재는 폴리페놀처럼 hydroxyl group을 구조 중에 포함하여 DPPH radical과 반응하기에 적합한 입체구조를 가지는 화합물이 존재하기 때문인 것으로 추정하였다. 본 연구에서도 목초액 자체는 DPPH radical 소거활성이 전혀 없었으나 이엠으로 생물전환시킨 후에는 DPPH radical 소거활성이 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타났다[그림 1]. 즉, 생물전환 목초액 0.3%, 0.6%, 1.2% 농도에서 DPPH radical 소거율은 각각 10.09±0.32%, 33.06±0.43%, 62.56±0.12%로 나타났다. 생물전환된 목초액의 DPPH radical 소거 활성이 증가

되는 것은 생물전환 시 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량의 증가에 따른 결과로 사료된다.



[그림 1] 생물전환 목초액의 DPPH radical 소거활성

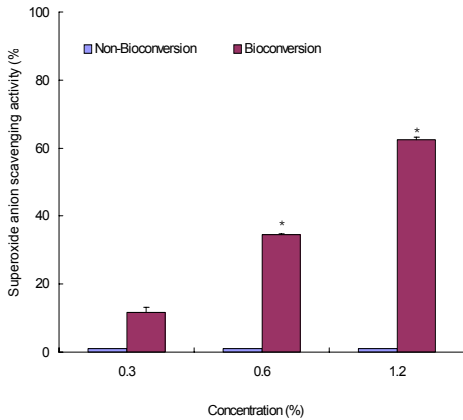
[Fig. 1] Effects of wood vinegar by non-bioconversion / bioconversion on the DPPH radicals scavenging activity

Results are the averages of three independent experiments±SD

*p < 0.05 compared with the control

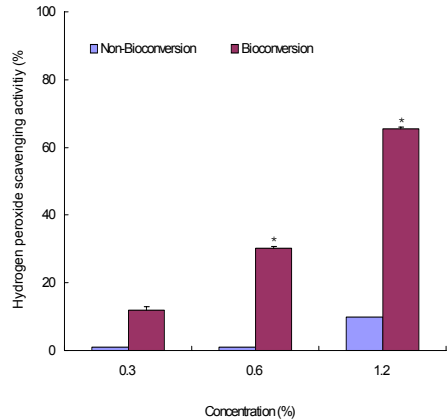
3.3.2 Superoxide anion radical 소거활성

생체 조직 중에서의 superoxide anion의 생성은 생체 내에서 산화환원 과정 중 산소 분자가 전자 수용체로 관여하는 경우가 많으며 그 결과 활성 산소의 생성이 가능 하다 할 수 있다. 특히, 미토콘드리아는 진핵세포에 있어서 에너지 획득의 경로이며 세포내에서 산소의 소비가 가장 많은 과립이기 때문에 그것의 내막에 존재하는 전자전달계에서 superoxide anion을 생성한다고 알려져 있다 [24]. 생물전환 전, 후 목초액의 superoxide anion (O₂⁻) 소거 활성을 실험한 결과 DPPH radical 소거활성의 결과와 유사한 양상을 나타내었다 [그림 2]. 즉, 생물전환 된 목초액의 경우 0.3%, 0.6%, 1.2% 농도에서 소거율이 각각 11.75±1.45%, 34.53±0.36%, 62.35±0.83%로 농도 의존적으로 superoxide anion radical을 소거하는 것으로 나타났다. 생물전환 된 목초액에서 superoxide anion radical의 소거 활성이 증가되는 사실 또한 생물전환 시 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량의 증가에 따른 결과로 사료된다.



[그림 2] 생물전환 목초액의 superoxide anion radical 소거활성

[Fig. 2] Effects of wood vinegar by non-bioconversion / bioconversion on the superoxide radicals scavenging activity
Results are the averages of three independent experiments±SD
* $p < 0.05$ compared with the control



[그림 3] 생물전환 목초액의 hydrogen peroxide radical 소거활성

[Fig. 3] Effects of wood vinegar by non-bioconversion / bioconversion on the hydrogen peroxide radicals scavenging activity
Results are the averages of three independent experiments±SD
* $p < 0.05$ compared with the control

3.3.3 Hydrogen peroxide radical 소거활성

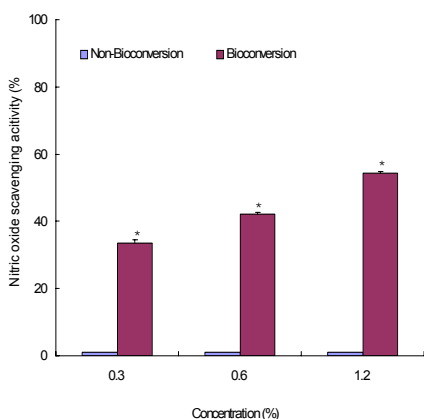
Hydrogen peroxide는 산소의 환원 대사 물질로서 미토콘드리아나 peroxisome 등의 정상 세포로부터 형성되거나 다양한 외부 요인에 의해 형성되는데, DNA 및 단백질 손상을 유발하거나 생체막의 구성성분인 불포화 지방산을 공격하여 과산화지질 형성으로 생체 기능의 저하나 노화 및 성인병을 유발하는 것으로 알려져 있다 [25,26].

생물전환 전, 후 목초액의 hydrogen peroxide radical 소거 활성을 측정한 결과 superoxide anion 과 DPPH radical 소거 활성과 비슷한 경향을 나타내었다[그림 3]. 즉, 생물전환 된 목초액의 경우 0.3%, 0.6%, 1.2% 농도에서 소거율이 각각 $11.91 \pm 0.97\%$, $30.12 \pm 0.64\%$, $65.57 \pm 0.42\%$ 로 농도 의존적으로 hydrogen peroxide radical을 소거하는 것으로 나타났다.

3.3.4 Nitric oxide (NO) radical 소거활성

아질산염은 우리가 흔히 섭취하는 생선이나 육류 등에 발색, 풍미 증진, 항균 작용 및 산패 방지를 위해 첨가제로 많이 이용되고 있지만 이러한 아질산염을 섭취했을 경우 동물이나 인체의 위내에서 아민류와 반응하여 발암성 물질로 알려진 nitrosamine을 생성하게 된다. 따라서 인체에 유해한 물질이라고 할 수 있는 아질산염을 효과적으로 제거할 수 있는 식물유래 천연물에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다 [27,28]. Nitric oxide (NO)는 생체 내에서 기질인 L-arginine이 nitric oxide synthase (NOS)의 작용으로 citrulline과 함께 생성된다. 생체 내에서 과량으로 생성된 NO는 미토콘드리아의 기능 억제, FeS 함유 효소기능 저하, DNA 손상 유발 및 각종 효소의 작용을 억제하는 것으로 알려져 있다[29].

활성산소종 (ROS) 중에서 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 NO radical 소거활성을 관찰한 결과 생물전환 이전의 목초액에서는 활성이 나타나지 않았으나, 이엠으로 생물전환을 실시한 이후에는 전체적으로 다른 라디칼 소거활성과 비슷한 양상으로 높아진 것으로 나타났다 [그림 4]. 즉, 생물전환 된목초액의 경우 0.3%, 0.6%, 1.2% 농도에서 소거율이 각각 $33.44 \pm 0.97\%$, $42.06 \pm 0.64\%$, $54.38 \pm 0.42\%$ 로 농도 의존적으로 NO radical을 소거하는 것으로 나타났다.



[그림 4] 생물전환 목초액의 nitric oxide radical 소거활성
[Fig. 4] Effects of wood vinegar by non-bioconversion / bioconversion on the nitric oxide radicals scavenging activity
 Results are the averages of three independent experiments±SD
 * $p < 0.05$ compared with the control

4. 결론

향후 천연 항산화제 개발 가능성에 대한 기초자료를 제공하고 그 이용성을 증대시키기 위하여 목초액을 이엠으로 생물전환한 후 총 폴리페놀, 총 플라보노이드, 총산도, 초산의 함량, pH 및 항산화 활성의 변화를 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 생물전환 전, 후 목초액의 총산도, 초산, pH를 측정 한 결과 유의성 있는 차이가 관찰되지 않았다.
2. 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과 총 폴리페놀의 경우 생물전환 전의 목초액에 비해 생물전환 후의 목초액에서 200배 이상 증가된 것으로 나타났으며, 총 플라보노이드의 경우 생물전환 전에 비해 약 2.3배 정도 증가된 것으로 나타났다.
3. DPPH, superoxide anion, hydrogen peroxide 및 nitric oxide radical에 대한 소거활성을 측정한 결과 생물전환 전의 목초액에서는 소거활성이 낮거나 나타나지 않았으나 이엠으로 생물전환시킨 후에는 DPPH, superoxide anion, hydrogen peroxide 및 nitric oxide radical을 농도 의존적으로 소거하는 것으로 나타나 전체적으로 생물전환 이후에 항산화 활성이 증가된 것으로 나타났다.

결론적으로 목초액은 생물전환 후 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 함량 및 항산화 활성이 크게 증가되는 것으로 보아 향후 천연 의약품 및 화장품 소재로 적용 가능할 것으로 사료된다.

References

- [1] K. M. Lee, G. T. Jeong and D. H. Park, "Study of antimicrobial and DPPH radical scavenger activity of wood vinegar", Korean J. Biotechnol. Bioeng., 19, 5, pp. 381-384, 2004.
- [2] F. Z. Lee, S. H. Choi and J. B. Eun, "The nitrite scavenging and electron ability of bamboo smoke distillates made by steel kiln and earth kiln", Korean J. Food Sci. Technol., 34, pp. 719-724, 2002.
- [3] Y. H. Kim, S. K. Kim, K. S. Kim and Y. H. Lee, "Composition of constituents of commercial wood vinegar liquor in Korea", J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol., 44, pp. 262-268, 2001.
- [4] A. Yasuhara and G. Sugiura, "Volatile compounds in pyroigneous liquids from Karamatu and Chisima-sasa", Agric. Biol. Chem., 51, pp. 3049-3060, 1987.
- [5] H. Yoshimura and T. Hayakawa, "Promoting effect of wood vinegar compounds on the mycelial growth of two Basidiomycete", Tran. Myco. Soc. Japan, 34, pp. 141-151, 1993.
- [6] B. Y. Hwang, J. H. Cho, Y. M. Chin and S. Yoshihiro, "Component Analysis of Softwood Vinegar", J. Kor. For. En., 20, pp. 28-34, 2001.
- [7] K. M. Lee, G. T. Jeong and D. H. Park, "Study of antimicrobial and DPPH radical scavenger activity of wood vinegar", Korean J. Biotechnol. Bioeng., 19, pp. 381-394, 2004.
- [8] Y. Mitsuyoshi and U. Genji, "By-products of wood carbonization III", Mokuzai Gakkaishi, 33, pp. 521-529, 1987.
- [9] F. Z. Lee, S. H. Choi and J. B. Eun, "The nitrite scavenging and electron ability of bamboo smoke distillates made by steel kiln and earth kiln", Korean J. Food Sci. Technol., 34, pp. 719-724, 2002.
- [10] Y. H. Kim, S. K. Kim and Y. H. Lee, "Composition of constituents of commercial wood vinegar liquor in Korea", J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol., 44, pp. 262-268, 2001.
- [11] S. P. Kim and C. H. Nam, "Method of Apply oligeneous acid extraction and it's refining", KR

- 10-2007-0011199, 2007.
- [12] C. S. Ku, S. P. Mun, S. B. Park and S. D. Kwon, "Physicochemical changes of vinegars obtained from bamboo and wood during long term aging", *Mokkehe Konhak*, 30, pp. 74-79, 2002.
- [13] M. W. Byun, "A Method for Refining Wood Vinegar and Refined Wood Vinegar", KR 10-2007-0718235, 2007.
- [14] A. K. Lee and H. Y. Chung, "Biological activities of a Korean traditional prescription, *Negyondaebotang*", *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 33, pp. 28-33, 2004.
- [15] A. D. Folin and W. Denis, "A colorimetric method for the determination of phenols and phenol derivatives in urine", *J. Biol. Chem.*, 22, pp. 305-308, 1915.
- [16] M. I. Moreno, M. I. Isla, A. R. Sampeietro and M. A. Vatuone, "Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina", *J. Ethnopharmacol.*, 71, pp. 109-114, 2000.
- [17] M. S. Blois, "Antioxidant determination by the use of a stable free radical", *Nature*, 181, pp. 199-200, 1958.
- [18] H. Okamura, A. Mimura, Y. Yakou, M. Niwano and Y. Takahara, "Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata*", *Phytochemistry*, 33, pp. 557-561, 1993.
- [19] S. W. Park, S. K. Chung and J. C. Park, "Active oxygen scavenging activity of luteolin-7-O- β -D-glucoside isolated from *Humulus japonicus*", *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 29, 1, pp. 106-110, 2000.
- [20] H. Kato, I. E. Lee, N. V. Chuyen, S. B. Kim and F. Hayase, "Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidines", *Agric. Biol. Chem.*, 51, pp. 1333-1338, 1987.
- [21] H. J. Kim, B. S. Jun, S. K. Kim, J. Y. Cha and Y. S. Cho, "Polyphenolic compound content and antioxidative activities by extracts from seed, sprout and flower of safflower (*Carthamus tinctorius* L.)", *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 29, pp. 1127-1132, 2000.
- [22] H. K. Kim, Y. E. Kim, J. R. Do, Y. C. Lee and B. Y. Lee, "Antioxidative activity and physiological activity of some Korean medicinal plants", *Korean J. Food Sci.*, 27, pp. 80-86, 1995.
- [23] B. J. An, J. T. Lee, S. A. Lee, J. H. Kwak, J. M. Park, J. Y. Lee and J. H. Son, "Antioxidant effects and application as natural ingredient of Korean *Sanguisorbae officinalis* L.", *J. Korean Soc. Appl. Biol.*, 47, pp. 244-250, 2004.
- [24] W. F. Petrone, D. K. English, K. Wong and J. M. McCord, "Free radicals and inflammation: superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, pp. 1159-1163, 1980.
- [25] T. Finkel and N. J. Holbrook, "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing", *Nature*, 408, pp. 239-247, 2000.
- [26] J. L. Martindale and N. J. Holbrook, "Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival", *J. Cell Physiol.*, 192, pp. 1-15, 2002.
- [27] M. Greenblatt, S. Mirvish and B. T. So, "Nitrosamine studies : induction of lung adenomas by concurrent administration of sodium nitrite and secondary amines in Swiss mice", *J. National Cancer Institute*, 46, pp. 1029-1034, 1971.
- [28] J. A. Lim, B. W. Yun and S. H. Beak, "Antioxidative activity and nitrite scavenging of methanol extract from *Salvia plebeia* R. Br.", *Korean Journal of medicinal Crop Science*, 15: 183-188, 2007.
- [29] F. J. Cui, T. Z. Li, S. J. Lee, S. J. Park, Y. Lim, K. A. Kim, B. J. Chang, J. H. Lee, M. H. Lee and N. H. Choe, "The effects of air-borne particulate matters on the alveolar macrophages for the iNOS expression and nitric oxide with nitrotyrosylated-proteins formation", *Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 60, pp. 426-436, 2006.

조 영 호 (Young-Ho Cho)

[정회원]



- 2003년 2월 : 대구대학교 일반대학원 생물공학과(공학박사)
- 1996년 3월 ~ 2006년 12월 : 한불화학(주) 기술연구소 책임연구원
- 2007년 3월 ~ 현재 : 건양대학교 제약공학과 교수

<관심분야>

피부 면역 증진 소재 및 제형 개발, 기능성 화장품 소재 개발, 난용성 생리활성물질의 가용화 기술 및 제제 개발

조 재 수(Jae-Soo Cho)

[정회원]



- 2010년 3월 : 건양대학교 일반대학원 제약공학과(박사과정)
- 2005년 9월 ~ 현재 : (주)젠트로 기술연구소 소장

<관심분야>

생물전환을 이용한 기능성 소재 개발

이 계 원(Gye-Won Lee)

[정회원]



- 1995년 8월 : 충남대학교 약학대학 (약학박사)
- 1995년 9월 ~ 2002년 2월 : 충남보건환경연구원 연구사
- 2002년 3월 ~ 현재 : 건양대학교 제약공학과 교수

<관심분야>

약물 전달 시스템(DDS), 난용성 약물의 가용화 및 나노제제기술, Method validation development